



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Area: Biología

Subárea: Biología Celular y Molecular

Tesis de Doctorado

**“Evaluación funcional de proteínas de
respuesta al estrés abiótico en las plantas
modelo *Physcomitrella patens* y
Arabidopsis thaliana”**

Mag. María Cecilia Ruibal Croce

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal
Facultad de Ciencias-UdelaR

Orientador: Dra. Sabina Vidal

Co-orientador: Dr. László Szabados

Tribunal de Tesis:

Presidente: Dr. Omar Borsani

Vocales: Dra. Ana Ramón y Dra. Inés Ponce de León

14 de Diciembre de 2015

Contenido

Abreviaciones	2
Agradecimientos	6
Resumen	7
Introducción	8
Estrés abiótico	8
Percepción y transducción de la señal de estrés	18
Ácido abscísico.....	18
Genes inducidos por estrés	20
Dehidrinas	24
Proteínas de Heat shock	25
Proteínas de respuesta al frío.....	31
Objetivo general	34
Objetivos específicos	34
Materiales y métodos	35
Estrategia	48
Resultados.....	50
1-Caracterización funcional de dehidrinas de P. patens	50
Discusión.....	68
2-Caracterización funcional de PpHsp16.4 de P.patens.....	73
Discusión.....	83
3-Caracterización funcional de PpWCOR413 de P.patens.....	86
Discusión.....	96
Conclusiones y perspectivas.....	99
Referencias.....	101

Abreviaciones

<i>A.thaliana</i>	Arabidopsis thaliana
AA	Aminoácido
ABA	Ácido absísico
ABF	ABRE Binding Factor
ABI	ABA insensitive
ABRE	ABA-responsive element
ACD	Alfa cristallin domain
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AKR2A	Ankirina 2A
APX	Ascorbato peroxidasa
AREB/ABF	Proteínas de unión a ABRE
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AtHK1	Arabidopsis thaliana histidine kinase-1
ATP	Adenosil trifosfato
<i>B.distachyon</i>	Brachypodium distachyon
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumine
bZIP	Dominio en cremallera de leucina básico
C-terminal	Carboxi-terminal
Ca ²⁺	Calcio
CaS	Calosa sintasa
CaM	Calmodulina
CBF	C-repeats Binding Factors
CBF/DREB	Factores de unión a repetidos C
CBL	Calcineurine B Like Protein
Cd	Cadmio
CDPK	Calcium-dependent protein kinase
CHLH	Subunidad H Mg-quelatasa
COR	Cold regulated
COS	Controlled cDNA Overexpression System
Ctl	Control
DHN	Dehidrina
DRE	Dehydration Responsive Element
DREB	DRE Binding
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
ERD	Early Dehydration-inducible

EST	Expressed Sequence Tag
FCA	Proteína Controladora de la Floración
Fv/Fm	Eficiencia Máxima del PSII
G418	Resistencia a genética
GFP	Green Fluorescent Protein
GPCR	G-Proteins Coupled Receptors
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
Hs	Horas
HSC	Heat Shock Cytosolic Complex
HSE	Heat Shock Elements
HSF	Heat Shock Factors
HSG	Heat Shock Granules
HSP	Heat Shock Proteins
Hyg	Hygromycin
kDa	Kilo Daltons
Kin	Cold-inducible
kpb	Kilo pares de bases
LB	Medio Luria-Bertani
LEA	Late Embryogenesis Abundant
LHCSR	Light harvesting complex stress-related
LiCl	Cloruro de Litio
LTI	Low Temperature Induced
LZ	Lizosima
MAP	Mitogen-activated Protein
MES	Monohydrate 2-ethanesulfonic acid
Mg ²⁺	Magnesio
mL	Mili litros
mM	Mili molar
Mn ²⁺	Manganeso
MOPS	Ácido 3-N-morfolinopropansulfónico
MS	Medio Murashige & Skoog
MtI	Manitol
MV	Metil Viológeno
MW	Molecular Weight
N-terminal	Amino-terminal
Na ²⁺	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
NOS	Nopaline sintase
NPQ	Non-photochemical quenching
nptII	Neomycin phosphotransferase II
ocs	Octapine sintase

ORF	Open Reading Frame
<i>P.patens</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
p35S	Promotor del virus de mosaico del coliflor
pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PEG	Polietilenglicol
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PSBS	Photosystem II subunit S
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PtdOH	Phosphatidic acid
PX	Peroxidasa
PYL	PYR Like
PYR	Pyrabactin Resistance
qE	Quenching de energía
qI	Quenching inhibitorio
qZ	Zeaxantine quenching
RCAR	Regulatory Component of ABA Receptor
RCD1	Radical-induced Cell Death1
RD	Responsive to desiccation
RLK	Receptor like kinases
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPK1	Receptor-like kinase1
SA	Ácido salicílico
SDS	Dodecilsulfato sódico
Ser	Serina
sHSP	Small Heat Shock Protein
SOD	Superóxido dismutasa
SOS	Salt Overly Sensitive
SP1	Stable Protein 1
T-DNA	Transfer-DNA
TBS	Tris Buffered Saline
TCEP	Tris-2-carboxyethyl-phosphine
Thr	Treonina
TM	Dominio transmembrana
UTR	Untranslated Region
UV	Luz Ultravioleta
UVB	Luz Ultravioleta B
v/v	Volumen/volumen
VDE	De-epoxidasa violaxantina

WCOR	Wheat Cold Responsive
wt	Wild type
YFP	Yellow Fluorescent Protein
λ	Lambda
μE	Flujo de fotones en $\text{mmol/m}^2.\text{seg}$
μL	Micro litro
μM	Micro molar

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la persona más importante en mi carrera académica: mi "jefa". Gracias Sabi por de ser mi tutora en todo mi trabajo, por enseñarme todo lo que sé, y por siempre estar pendiente de todo lo que pasa a tu alrededor. Gracias por ser mi amiga, por esas enseñanzas de vida, y sobre todo de fortaleza ilimitada, que nunca voy a poder imitar ni alcanzar, pero alcanzan para opacar las cosas cotidianas "malas" que me pasan inútilmente. Gracias por el ambiente que generas a tu alrededor, y hacer que me levante cada día deseando ir a trabajar.

Gracias a todo el equipo BMV, por el grupo lindo que formamos hoy, y por los grupos que siempre hemos formado. Gracias a Alex, por hacer una dupla complicada siempre con horarios y pañales, pero por hacer que esta dupla tenga resultados muy lindos y siempre tener en nuestras manos ese "Science"...., aunque solo en nuestras cabezas.... Gracias a Marcel, Lu, Jp, Pedro, y a todos los que compartimos todos los días lindos momentos.

Gracias siempre a los ex BMV, sobre todo a Vale, siempre presente en todas mis tesis, por acompañarme desde el principio.

A László Szabados, y su grupo del BRC, por abrirme las puertas de su Laboratorio, y dejarme hacer durante tanto años seguidos los experimentos que quisiera! Y por hacerme finalmente extrañar tanto Szeged!

A Gastón Quero, por la ayuda con las medidas con el maldito PAM, que lo odié, pero finalmente "aprendí" a manejar!

Quiero agradecer a mi familia, por el respaldo firme e infinito, por el esfuerzo de mis padres (que hoy en día como madre me doy más cuenta), de hacer todo lo posible y hasta imposible por darme un hogar a 400 km de distancia.

Y gracias a Franco por ser mi contención, por escucharme y darme consejos. Gracias por la hermosa familia que hemos formado, la cual es hoy en día mi prioridad y mi única razón de ser.....

Resumen

El estrés generado por factores abióticos como son las temperaturas extremas y la falta o el exceso de agua, representa frecuentemente la primera causa de pérdida de rendimiento en los cultivos. Las plantas responden a estos tipos de estrés tanto a nivel molecular, celular, como fisiológico. Si bien los distintos factores de estrés inducen en las plantas la expresión de numerosos genes, la mayoría de estos no tienen una función asignada, y por lo tanto se desconoce si cumplen un rol en las respuestas adaptativas al estrés.

Physcomitrella patens, constituye desde poco más de una década un modelo vegetal con grandes ventajas para realizar estudios de genética reversa, por tener una alta frecuencia de recombinación homóloga, haciendo posible la inserción dirigida de ADN mediante reemplazo alélico. Esto, y el hecho de que presenta una alta tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico confieren a este organismo ventajas significativas para el estudio funcional de genes y proteínas involucradas en la tolerancia al estrés.

Nuestro grupo se ha centrado en la búsqueda e identificación de genes nuevos de *P.patens* con posible función en la tolerancia al estrés salino y osmótico. Dentro de los genes estudiados en este trabajo se encuentran dos dehidrinas (PpDHNA y PpDHNB), una proteína de heat shock pequeña, denominada PpHsp16.4 y una proteína perteneciente a la familia WCOR413 (Wheat Cold Regulated 413), denominada aquí PpCOR413. Estos genes pertenecen a familias ampliamente conservadas en todo el reino vegetal y sobre los cuales existen limitadas o nulas evidencias genéticas directas que indiquen qué función cumplen en la respuesta al estrés abiótico en plantas. En este trabajo se evaluaron funcionalmente los genes *PpDHNA*, *PpDHNB*, *PpHsp16.4* y *PpCOR413* mediante la generación y la caracterización fenotípica de mutantes *knockout* en *P.patens*. Los resultados de estos estudios demostraron que tanto los genes pertenecientes a la familia de las DHNs, como *PpHsp16.4* son requeridos por *P.patens* en el proceso de recuperación del estrés, teniendo, en el caso de las DHNs, un rol más importante *PpDHNA* que *PpDHNB*. Por otro lado, la expresión heteróloga de las DHNs en *Arabidopsis thaliana* aumentó la tolerancia al estrés osmótico y salino, así como la capacidad de recuperación del estrés en estas plantas. Finalmente, el este trabajo muestra la primera evidencia genética funcional para un gen perteneciente a la familia WCOR413. Nuestros estudios indican que *PpCOR413* está involucrado en la respuesta adaptativa a la luz, en particular al exceso de luz, y posiblemente a la protección del aparato fotosintético durante el estrés por frío.

Introducción

La tolerancia a la deshidratación es un fenómeno de adaptación al hábitat terrestre muy antiguo dentro del reino vegetal. Los musgos (briofitas) habrían sido las primeras plantas adaptadas a la vida fuera del agua y es frecuente que manifiesten resistencia vegetativa a la desecación. Para poder adaptarse a la vida terrestre y poder sobrevivir a estas nuevas condiciones, las plantas han tenido que desarrollar estrategias para poder evitar el estrés por falta de agua o adaptarse al mismo. En la evolución de las plantas vasculares, la resistencia a la desecación existe fundamentalmente en estructuras reproductivas o de propagación, como el polen, las esporas y las semillas (Oliver et al., 2000). Los musgos divergieron de las plantas vasculares luego de la colonización terrestre de las mismas, con lo cual es de mucha utilidad el estudio de los mecanismos que conllevaron esta adaptación hacia condiciones fisicoquímicas de un ambiente aéreo (Rensing et al., 2008). En la tierra, las concentraciones de oxígeno, un inhibidor de la fotosíntesis, son mayores que en el agua (Scott y Glasspool 2006), mientras que las concentraciones de dióxido de carbono, el aceptor final de los electrones extraídos del agua, se encuentran por lo general en menores proporciones que en el agua. Además, la forma sésil de la vida de las plantas fuera del agua hace que éstas deban adaptar su fisiología a los cambios abruptos en las intensidades de luz, mientras que las algas pueden escaparse de estas condiciones sumergiéndose más profundo en el agua (Waters 2003).

Muchas algas y musgos sensibles a la deshidratación evitan el estrés hídrico mediante la colonización de nichos con altas cantidades de agua o el crecimiento en grupos densos de manera de limitar la evaporación. La evolución de los mecanismos para resistir el estrés hídrico surgió probablemente de organismos adecuados para ocupar los límites externos de estos nichos. Las traqueofitas, las plantas terrestres más complejas estructuralmente, desarrollaron un sistema vascular y barreras protectoras contra la pérdida de agua. Aunque todas las plantas pertenecientes a esta familia tienen células reproductivas especializadas que experimentan naturalmente un período de deshidratación (semillas, polen, esporas), la tolerancia a la falta de agua en los tejidos vegetativos es un proceso raro en las plantas vasculares. Muchas especies de briofitas, sin embargo, se han adaptado a la vida en nichos sin el beneficio de tener un sistema de transporte y de retención de agua. En este sentido, las briofitas son organismos poiquilohídricos, los cuales poseen un contenido de agua equivalente al del medio ambiente. Debido a que el contenido de agua de los tejidos de las plantas poiquilohídricas se encuentran en un equilibrio continuo con el del medio ambiente, las briofitas son consideradas tolerantes a la desecación o a la deshidratación. Por otro lado, las plantas tolerantes a la desecación, más comúnmente llamadas plantas de resurrección, crecen en ambientes oscuros, como por ejemplo en rocas (Gaff 1977; Porembski y Barthlott 2000).

Las angiospermas tuvieron un empuje evolutivo importante mediante el desarrollo de diferentes estructuras, como lo son el desarrollo de una cutícula que resiste la falta de agua en los espacios intercelulares, la presencia de estomas que regulan la evaporación

de agua y el desarrollo de un sistema que transporta el agua como lo es el xilema, las cuales han sido muy eficaces en evitar las sequías. La mayoría de las especies de angiospermas tolerantes a la desecación tienen uno o más mecanismos que logran retardar la transpiración. Por ejemplo, algunas plantas desarrollan la capacidad de doblar sus hojas, otras poseen sus estomas en surcos, y algunas plantas poseen "pelos" en la superficie de sus hojas, todos ellos son mecanismos que evitan y evaden la deshidratación.

Por otro lado, los musgos tienen un ciclo de vida relativamente simple, y una arquitectura sencilla que les permite poder adaptarse a la pérdida de agua. Estos organismos carecen de aquellas propiedades que hacen que las traquiofitas minimicen la pérdida de agua, como por ejemplo, carecen de raíces propiamente desarrolladas, de un tejido vascular encargado de transportar el agua, y de estomas en la epidermis.

Physcomitrella patens ha recibido especial atención como organismo modelo para estudios evolutivos de los organismos fotosintéticos y de los mecanismos de respuestas al estrés abiótico, fundamentalmente. Esto se debe a sus características peculiares, entre las cuales se incluyen su estructura celular simple y la alta eficiencia de recombinación homóloga que ésta posee, la cual permite realizar estudios de genética reversa mediante la modificación dirigida de genes específicos (Schaefer y Zryd 1997). A finales del año 2007 se publicó la secuencia completa del genoma de *P.patens* (cepa Gransden 2004), en donde se determinaron 480 Mpb de secuencias en scaffolds con una profundidad de aproximadamente 8.6X, y en las cuales las secuencias expresadas (ESTs) cubren el 98% de las secuencias ensambladas (Rensing et al., 2007). La secuencia contiene 35,938 modelos génicos predichos y publicados. La mayoría de los genes predichos se encuentran avalados por diferentes tipos de evidencias, y el 84% de las secuencias de proteínas predichas se encuentran completas. Alrededor del 20% de los genes analizados tiene splicing alternativo, frecuencia similar a la encontrada en *A.thaliana* y en *O.sativa* (Shen et al., 2006).

Al igual que los musgos, el ciclo de vida de *P.patens* se caracteriza por la alternancia de dos generaciones, una haploide gametofítica que produce gametos, y otra diploide esporofítica donde se producen las esporas. La propagación de *P.patens* se genera a partir de esporas haploides, las cuales producen una estructura filamentosa denominada protonema, compuesto por dos tipos de células, el cloronema, con numerosos cloroplastos, y el caulonema, que carece de este organelo. Los filamentos de protonema crecen a partir de sus células apicales y pueden originar ramificaciones laterales a partir de células subapicales. Algunas de estas células laterales se pueden diferenciar en callos, de los cuales se generan gametóforos, estructuras más complejas, formadas por estructuras del tipo de hojas, rizoides y los órganos sexuales femeninos, denominado arquegonia y masculinos, denominado anteridia. Estos órganos se encuentran en la misma planta, y su fecundación resulta en un cigoto diploide, lo cual origina nuevamente una espora (fig. 1).

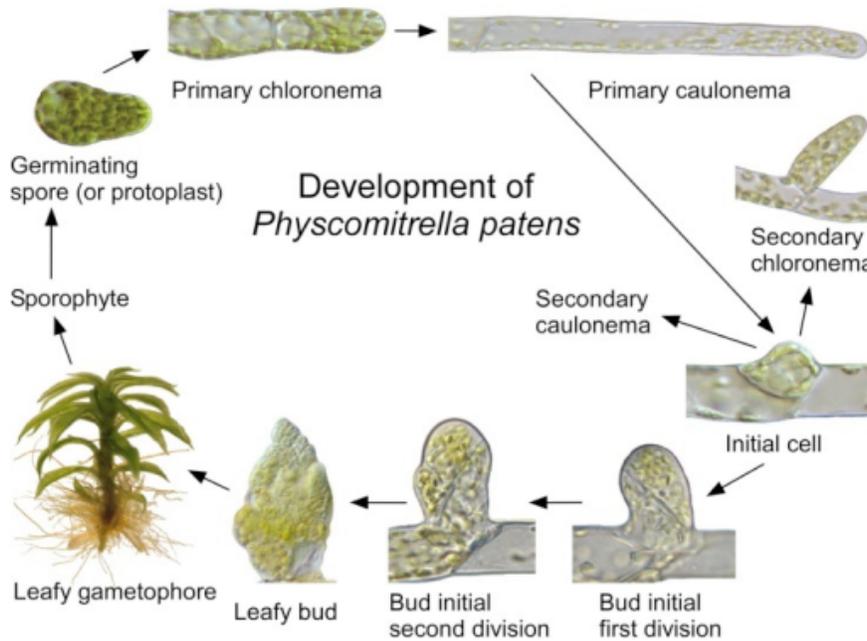


Figura 1: Ciclo de vida de *P.patens*. El esporofito germina dando lugar a dos tipos de tejidos primarios, el cloronema y el caulonema. Del caulonema secundario emerge una yema, la cual se divide dando lugar al gametofito. El gametofito se encuentra formado por rizoides y hojas, las cuales están constituidas por una sola capa de células.

Una herramienta poderosa para determinar la función biológica de genes *in vivo* es la genética reversa. *P.patens* es el primer musgo en ser transformado eficientemente (Schaefer et al., 1991), y más interesante es el primer eucariota multicelular en el cual ocurre la integración de ADN en el genoma mediante recombinación homóloga con una eficiencia similar a la observada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Schaefer y Zryd 1997; Schaefer 2001). La posibilidad de dirigir ADN exógeno a un locus en particular en *P.patens*, aporta herramientas valiosas para el análisis funcional de genes en estudio mediante la mutagénesis dirigida de su genoma.

En el 2012, Wang y colaboradores, realizaron un análisis sistemático en *P.patens* de la proteómica en respuesta a diferentes condiciones de estrés abiótico, entre los cuales se incluyeron el estrés salino, la deshidratación severa, bajas temperaturas y en respuesta a tratamientos con ABA. En este estudio se demostró que, a pesar de tener respuestas específicas de cada tratamiento, existen respuestas en común entre ellos. Las respuestas entre el ABA y la sal, o el ABA y la deshidratación fueron más común que las que existen entre el ABA y el frío, por ejemplo.

Estrés abiótico

Las plantas requieren fundamentalmente de energía (luz), agua y nutrientes minerales para su crecimiento. Al contrario que los animales, las plantas son organismos sésiles, por lo que requieren que los cambios ambientales sean rápidamente reconocidos, de manera de responder ante ellos de una manera eficiente. Entre los diferentes tipos de factores de estrés ambiental que pueden sufrir las plantas, se encuentra la falta o el exceso de agua,

la salinidad del suelo, las temperaturas extremas (frío o calor), los metales pesados, entre otros tantos. Estos factores representan un problema serio para la producción y el rendimiento de los cultivos en el mundo. Las plantas se enfrentan a estos diversos cambios ambientales durante su ciclo de vida, y han desarrollado distintas estrategias de adaptación a las condiciones ambientales adversas. Estas estrategias incluyen por un lado, los mecanismos que previenen la exposición al estrés y por otro lado respuestas que le permiten a la planta tolerar dicho estrés. Muchas de las respuestas al estrés son comunes a las distintas especies vegetales, y otras son específicas. Por ejemplo, muchas plantas del desierto tienen la habilidad de tolerar el déficit de agua debido a que sus características morfológicas facilitan la supervivencia en condiciones áridas. En éstas zonas existen plantas adaptadas a las sequías, cuyas raíces profundas les permiten absorber el agua de los suelos y así sobrevivir largos períodos sin lluvia. Otro mecanismo de tolerancia lo proporciona la aclimatación al estrés, durante la cual un organismo altera su metabolismo para mantener su homeostasis y así poder adaptarse al medio ambiente externo. Cuando se someten plantas vulnerables a un período de aclimatación antes de ser expuestas a un estrés específico, muchas especies vegetales son capaces de aumentar su resistencia a dicho factor.

Muchas condiciones ambientales producen un déficit de agua en las plantas. Los períodos de poca lluvia provocan sequía, las cuales, ya sean esporádicas o prolongadas, reducen la cantidad de agua disponible para el crecimiento de la planta. Sin embargo, las plantas que se encuentran en ambientes donde el agua no es limitante, pueden también sufrir de un déficit de agua. En ambientes salinos, por ejemplo, la presencia de altas concentraciones de sal hacen que a las raíces de las plantas les sea más difícil extraer agua del suelo. La exposición a bajas y altas temperaturas, también resultan en un estrés por deshidratación. En los últimos años se han realizado diversos esfuerzos en dilucidar las respuestas moleculares de las plantas al déficit de agua mediante el uso de la planta modelo *A.thaliana* (Ingram y Bartels, 1996; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Balsamo et al., 2015; Huang et al., 2015). La facilidad para llevar a cabo estudios genéticos en esta planta, gracias a su pequeño genoma y ciclo de vida corto, ha permitido la generación e identificación de mutantes en genes específicos que han aportado significativamente al conocimiento sobre los mecanismos moleculares involucrados en las respuestas al estrés.

Muchos de los mecanismos que se activan en respuesta a un determinado tipo de estrés, tienen como objetivo restablecer la homeostasis y proteger y reparar el daño causado en proteínas y membranas celulares (Wang et al., 2003). Se han identificado varios genes involucrados en la percepción del estrés, en la regulación de la expresión génica, así como efectores o genes que participan directamente en la protección del daño celular o la reparación del mismo luego de retirado el estrés.

En general, las respuestas genéticas al estrés abiótico son involucran muchos genes, y por lo tanto, el mejoramiento genético de los cultivos para aumentar su tolerancia al estrés es complejo. Las estrategias de ingeniería genética para incrementar la tolerancia al estrés abiótico en plantas (Wang et al., 2003) se pueden basar en la modificación de la expresión de genes involucrados en las vías regulatorias y de señalización (Seki et al., 2003;

Shinozaki et al., 2003), o de genes que codifican para proteínas que confieren tolerancia al estrés (Wang et al., 2004), o de enzimas presentes en las vías que producen la síntesis de metabolitos (Park et al., 2004; Apse y Blumwald 2002; Rontein et al., 2002).

Estrés salino

El estrés salino puede dividirse en dos componentes, un componente de estrés osmótico, y un componente de estrés iónico, como por ejemplo, la toxicidad del Na^+ (Munns y Tester, 2008).

Para poder tolerar las condiciones de alta salinidad, las plantas deben permanecer en un período de "dormancia" durante el episodio de salinidad o debe haber un ajuste celular para poder tolerar este estrés. Los mecanismos de tolerancia pueden estar categorizados como aquellos que minimizan el estrés osmótico o el desequilibrio iónico.

Mediante la selección de mutantes insensibles a la sal, se han identificado en *A.thaliana* tres mutantes llamados SOS (*salt overly sensitive*): *sos1*, *sos2* y *sos3* (Wu et al., 1996; Liu y Zhu 1997; Zhu et al., 1998), cuyos genes codifican para proteínas de transporte transmembrana, las cuales median el co-transporte Na^+/K^+ (Horie et al., 2009; Maser et al., 2002a; Maser et al., 2002b; Schachtman y Schroeder 1994; Shi et al., 2000; Shi et al., 2002). SOS1 interactúa con un regulador muy importante de la respuesta al estrés abiótico, denominado radical-induced cell death1 (RCD1) (Katiyar-Agarwal et al., 2006). Existe también otro grupo de transportadores, el Na^+/H^+ EXCHANGER AtNHX1, y sus ortólogos AtNHX2, 3, 4, 5 y 6, los cuales se encuentran involucrados en la compartimentalización del Na^+ dentro de la vacuola (Horie et al., 2009; Qiu et al., 2004; Yokoi et al., 2002). Mientras que estos transportadores son determinantes para la tolerancia a la salinidad, existe muy poca evidencia que relacione a éstos con la percepción de la sal (Horie et al., 2009). SOS1 se encuentra regulado mediante la fosforilación de su dominio C-terminal por la proteína quinasa SOS2, la cual pertenece a la familia de proteínas Sucrose non-fermenting1-related (Quintero et al., 2011). Por otro lado, SOS2 se encuentra regulado mediante interacciones con la proteína sensora de Ca^{2+} SOS3. Esto sugiere que el calcio es un regulador crítico del transporte del Na^+ y de la regulación de estrés osmótico/iónico. Todavía se desconoce el mecanismo de percepción y de señalización que producen cambios en las concentraciones de Ca^{2+} celulares, que como consecuencia resultan en una regulación diferencial de SOS1.

La tolerancia a diferentes concentraciones de sal depende del tipo de planta, mientras que *A.thaliana* no tolera concentraciones de cloruro de sodio por encima de los 100mM (Sunkar et al., 2003), *P.patens* es capaz de tolerar concentraciones de hasta 600mM (Benito y Rodriguez-Navarro 2003; Frank et al., 2005; Saavedra et al., 2006). Este alto grado de tolerancia ha sido atribuido a la presencia de dos bombas de Na^+ -ATPasa, ausente en angiospermas, denominadas PpENA1 y PpENA2 (Benito y Rodriguez-Navarro 2003), lo cual le permite excluir parte del Na^+ de las células hacia el espacio extracelular (Lunde et al., 2007). Esto implica que, o bien *P.patens* ha ganado este tipo de genes, o las plantas superiores los ha perdido a través de la evolución.

Estrés osmótico

Tanto la falta de agua como el estrés salino provocan en la célula una alteración en el balance osmótico, por lo que existe una relación entre ambos tipos de estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2007). La célula es capaz de sentir el estrés osmótico mediante mecanismos indirectos de percepción, es decir, un osmosensor puede percibir otras propiedades celulares que se encuentran afectadas mediante el estrés osmótico, como por ejemplo el volumen celular, la presión de turgencia, la estabilidad de la membrana, las concentraciones de algunos solutos particulares, y la cantidad de macromoléculas o iones en el citoplasma (Wood et al., 2001).

El cierre estomático, la disminución en el crecimiento celular y en la tasa fotosintética, y el aumento en la tasa de respiración, son fenómenos generales que pueden observarse en las plantas cuando éstas se ven sometidas a un estrés osmótico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2007). A nivel molecular se acumulan una serie de proteínas y osmolitos que permiten sobrellevar el cambio en este tipo de estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2007). Entre estos se encuentra la acumulación de metabolitos que actúan como solutos compatibles cuya función es bajar el potencial osmótico de la célula vegetal sin afectar las reacciones metabólicas normales (Hasewaga et al., 2000). Estos solutos compatibles son generalmente compuestos hidrofílicos con pesos moleculares pequeños y sin carga neta a pH fisiológico. Químicamente se dividen en cuatro clases: compuestos oniones (por ejemplo glicina betaína), azúcares o polialcoholes (por ejemplo manitol, D-ononitol, pinitol), aminoácidos (por ejemplo la prolina), y alcaloides (como por ejemplo trigonelina). Estos compuestos también tienen otras funciones protectoras además del ajuste osmótico. Por ejemplo, la glicina betaína puede estabilizar proteínas y membranas (Papageorgiou y Murata 1995), mientras que el manitol podría participar en el secuestro de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shen et al., 1997). Debido a esto es que estos solutos también se denominan osmoprotectores.

P.patens ha demostrado ser capaz de recuperarse de un estrés osmótico severo, generado por ejemplo por el agregado de manitol o sorbitol al medio de cultivo (Frank et al., 2005; Saavedra et al., 2006).

Muchos de los genes de respuesta a la falta de agua o a la salinidad, también se encuentran regulados por el ABA (Zhu 2002; Nakashima et al., 2009). Sin embargo, se sabe que las respuestas al estrés osmótico comprenden tanto vías dependientes como independientes del ABA (Bohnert y Sheveleva 1998; Nakashima et al., 2009).

Estrés hídrico

La mayoría de las plantas con flor no pueden sobrevivir a un déficit hídrico menor a una humedad relativa entre el 85% y el 98% (v/v) durante su período de crecimiento vegetativo, sin embargo, la desecación es una parte integral del desarrollo normal de la mayoría de las plantas superiores, esto es, durante la formación de las semillas. Solamente unas pocas especies de plantas poseen tejidos vegetativos tolerantes a la desecación. Entre ellas se encuentra un pequeño grupo de angiospermas, llamadas plantas de resurrección, algunas algas, briofitas, líquenes y helechos. Algunas de estas

especies son capaces de equilibrar sus hojas con un aire con 0% de humedad relativa (v/v). Las bases fisiológicas de la tolerancia a la desecación de las plantas de resurrección son complejas. Algunos mecanismos varían según las diferentes especies; por ejemplo, algunas especies retienen clorofila durante la deshidratación, mientras que otras pierden este pigmento. Análisis de los efectos causados por la deshidratación revelaron una remarcable tolerancia de *P.patens*, mostrando que estas plantas son capaces de rehidratarse luego de la pérdida de hasta un 92% de su peso fresco (Frank et al., 2005). Según la definición propuesta por Hoekstra y colaboradores en el 2001, se puede considerar a *P.patens* como una planta tolerante a la deshidratación. En un trabajo reciente, Khandelwal y colaboradores (2010) demostraron que cuando se pretratan plantas de *P.patens* con ABA y luego son deshidratadas totalmente, estas plantas son capaces de recuperarse de la desecación cuando se vuelven a rehidratar. La generación de líneas de *P.patens* donde los genes codificantes para los factores de transcripción ABI3 fueron deletados, mostró que las vías de expresión de genes regulados tanto por ABA como por los factores de transcripción ABI3, se encuentran involucrados en la protección celular al déficit de agua y son esenciales para la recuperación de la desecación en las briofitas (Khandelwal et al., 2010). Estos estudios en su conjunto le atribuyen al ABA una función crucial en las respuestas de tolerancia a diversos factores de estrés en *P.patens*. Análisis moleculares han revelado la existencia de elementos en *cis* específicos que median la activación de varios genes bajo diferentes condiciones de estrés. El elemento de respuesta a la deshidratación (dehydration responsive element o DRE), contiene una secuencia conservada de 9 pares de bases (TACCGACAT), el cual fue descubierto por primera vez en la secuencia promotora del gen *rd29A* (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 1993). Este elemento es esencial para la inducción de la expresión del gen *rd29A* por estrés hídrico y también por el estrés por bajas temperaturas, pero no por aplicaciones con ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 1994; Saleh et al., 2005). En el año 1994, Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, reportaron el descubrimiento de proteínas de unión a esta secuencia, las cuales denominaron DREB (DRE binding). Estos factores de transcripción fueron luego reportados en respuesta a varios tipos de estreses abióticos, tanto en vías dependientes como independientes de ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 1994; Busk et al., 1997; Liu et al., 1998; Kizis y Page's 2002; Dubouzet et al., 2003).

Estrés por bajas temperaturas

Las bajas temperaturas pueden llegar a causar un estrés hídrico, afectando las relaciones hídricas celulares. A temperaturas bajo cero, el potencial químico del hielo formado es menor al del agua líquida. La presión de vapor del hielo extracelular es también menor que la del agua citoplasmática o vacuolar. Como la formación del hielo se inicia en los espacios intercelulares, el agua celular se mueve bajo el gradiente de potencial hídrico, a través de la membrana plasmática y alrededor del hielo extracelular. Por lo tanto, en la célula se genera un déficit en la cantidad de agua en respuesta a las bajas temperaturas. Algunas plantas tolerantes a las bajas temperaturas promueven la formación de cristales

de hielo en el citoplasma. Un mecanismo diferente es la acumulación de proteínas anti-congelantes en el apoplasto, la cual enlentece la formación de este hielo retardando la deshidratación celular (Griffith et al., 1992; Marentes et al., 1993; Antikainen et al., 1996; Griffith y Yaish 2004).

La habilidad de las plantas de sobrevivir a temperaturas de congelamiento es específica del genotipo de éstas. Algunas plantas resisten temperaturas por debajo de los -40°C . Sin embargo, estas plantas no son tolerantes al congelamiento durante las estaciones en las que crecen. La tolerancia a la congelación se genera en un proceso llamado aclimatación al frío, la cual es una respuesta a las bajas temperaturas anteriores a la congelación. Los mecanismos de aclimatación a temperaturas por debajo de los 0°C son objeto de intensos estudios. *A.thaliana* es un modelo de estudio capaz de aclimatarse al frío. Luego de su exposición de uno a cinco días a temperaturas en el rango de entre 1°C a 5°C , *A.thaliana* puede sobrevivir temperaturas entre los -8°C y -12°C , lo cual la hace un buen modelo para estudiar el proceso de aclimatación al frío.

Varios estudios han permitido dilucidar el rol que cumple el ABA en las respuestas adaptativas de *P.patens* a diversas condiciones de estrés abiótico. Minami y colaboradores (2003) demostraron que el tratamiento con ABA previo a la exposición de *P.patens* a temperaturas de congelamiento aumenta significativamente la tolerancia a las bajas temperaturas. Las temperaturas letales para una mortalidad del 50% en *P.patens* en el tejido protonema es de -2°C (Nagao et al., 2005), pero si se realiza una adaptación a 0°C durante 7 días, esta temperatura disminuye de -2°C a $-3,5^{\circ}\text{C}$ (Minami et al., 2005). Sin embargo, cuando se realizan pre tratamientos con $10\mu\text{M}$ de ABA durante 1 día, la tolerancia aumenta a -10°C (Nagao et al., 2005) y con $100\mu\text{M}$ hasta -80°C (Oldenhof et al., 2006).

La deshidratación inducida por temperaturas muy bajas puede tener numerosos efectos, los cuales tienen como resultado el daño celular, como por ejemplo la desnaturalización de proteínas y la precipitación de varias moléculas. Sin embargo, el daño mejor documentado ocurre a nivel de la membrana (Steponkus et al., 1992). La estructura de membrana se ve alterada cuando la deshidratación inducida por las bajas temperaturas acerca a la membrana plasmática con la de los organelos como por ejemplo cloroplastos. Esto produce la desestabilización de la membrana, causa primaria del daño celular. A temperaturas relativamente bajas, entre -2°C y -4°C , el daño que predomina en las plantas no aclimatadas es la lisis inducida por expansión, la cual es causada por la contracción osmótica y el ciclo expansivo que ocurre con el congelamiento. A temperaturas menores, entre -4°C y -10°C , la forma predominante de daño en las plantas no aclimatadas es la transición desde la fase lamelar a la fase hexagonal II inducidas por frío, un evento inter-bicapa que involucra la fusión de membranas celulares. A temperaturas inferiores a -10°C , con el consecuente menor potencial hídrico y la mayor severidad de la deshidratación, pueden ocurrir otras formas de daño en la membrana, incluyendo lesiones de fractura.

Tanto el estrés oxidativo como la desnaturalización proteica pueden ocurrir como respuesta al congelamiento. La tasa de congelación, temperatura a la cual se forman

cristales de hielo, y la localización subcelular del congelamiento pueden afectar muy fuertemente el daño celular.

La tolerancia al frío involucra procesos como la estabilización de las membranas y la acumulación de azúcares, otros osmolitos y de proteínas anti-congelantes, los cuales permiten la prevención de la desnaturalización de proteínas, la prevención de la precipitación de moléculas, y la disminución del daño físico directo causado por la acumulación de hielo intercelular. Sin embargo, la aclimatación a las bajas temperaturas involucra la estabilización de las membranas contra el daño inducido por el frío, el cual se relaciona con varios mecanismos. Uno de los mecanismos es el cambio en la composición lipídica de la membrana, entre los cuales se encuentran el aumento en la desnaturalización de los ácidos grasos de los fosfolípidos y cambios en la abundancia de varios esteroides y cerebrosidos. Además, la acumulación de sacarosa y otros azúcares simples también contribuyen a la estabilización de las membranas (Anchordoguy et al., 1987). Finalmente, existen varias evidencias que demuestran que los polipéptidos hidrofílicos ayudan a estabilizar las membranas contra el daño inducido por frío.

Estrés por altas temperaturas

Las temperaturas elevadas desencadenan en plantas respuestas metabólicas y celulares características, muchas de las cuales están ampliamente conservadas entre distintos organismos. La respuesta más común al estrés por calor es la disminución de la síntesis proteica general, acompañada de la transcripción y traducción específica de un nuevo set de proteínas denominadas proteínas de shock térmico (HSPs). Esta respuesta se observa cuando las plantas son expuestas a temperaturas por lo menos 5°C mayores a la temperatura óptima de crecimiento (Miernyk 1997; Renaut et al., 2006).

Las altas temperaturas también provocan daños en las estructuras celulares, incluyendo organelos y el citoesqueleto, y desestructuran la función de la membrana. Algunos organismos de fácil manipulación genética como *E.coli*, *A.thaliana* y levaduras, han sido utilizados ampliamente para estudiar los cambios metabólicos y celulares que se requieren para sobrevivir a las altas temperaturas.

El shock térmico puede generarse por varias circunstancias temporales, con resultados que varían desde el retardo en el crecimiento, órganos dañados y hasta la muerte de la planta. En el campo, el shock térmico se puede generar en la planta cuando la transpiración en las hojas es insuficiente. Esto puede darse por ejemplo, cuando el agua es limitante y las temperaturas son altas o cuando los estomas están parcial o totalmente cerrados y la irradiación es alta. También en la germinación de las semillas, cuando la tierra se recalienta por el sol, las plántulas pueden estar sometidas a un shock térmico, o en los órganos con capacidad reducida de transpiración (por ejemplo, los frutos), por las altas temperaturas del ambiente. La duración y severidad del estrés, la susceptibilidad de los diferentes tipos celulares, y el estado de desarrollo de la planta, tienen una influencia en la capacidad de un determinado genotipo de sobrevivir al estrés por altas temperaturas.

Las plantas tienen la capacidad de adquirir termotolerancia si son expuestas a temperaturas altas pero no letales (permisivas) por unas pocas horas, antes de someterlas a condiciones de shock térmico (Larkindale et al., 2005). Cuando se aclimatan semillas de *A.thaliana* a 45°C, se acumulan una serie de transcriptos (Mittler et al., 2012), los cuales aumentan durante un tratamiento gradual de aclimatación. La mayoría de estos genes nuevos codifican para diferentes chaperonas moleculares, como por ejemplo sHSPs y HSP70s, además de enzimas de respuesta a ROS como ascorbato peroxidasa. Así, frente a la exposición a los aumentos moderados de temperaturas (Larkindale y Vierling 2008), las plantas envían una señal temprana para la acumulación de HSPs y metabolitos, además de reajustar de pH y el potencial redox, reduciendo la tasa fotosintética y de transpiración (Mittler et al., 2012). Estos mecanismos establecen la termotolerancia adquirida, una habilidad que poseen las plantas a una exposición limitada, típicamente por un par de horas, a temperaturas que de otro modo serían letales. Esta termotolerancia adquirida generalmente se mantiene durante un período de aproximadamente 2 días (Charnig et al., 2007).

Por otro lado, mientras que plantas de *P.patens* crecidas durante 7 días a 32°C son capaces de recuperarse del estrés, si esta temperatura aumenta a 40°C, estas plantas no se recuperan (Saidi et al., 2009). La aclimatación a las altas temperaturas en *P.patens* no se encuentra estudiada hasta el momento.

Estrés lumínico

Las plantas están sometidas a cambios permanentes en la intensidad de la luz. Estos cambios pueden ocurrir en distintas escalas de tiempo, pueden ser de segundos, por ejemplo debido a la aparición de nubes, o hasta de días o meses, durante los cambios de estaciones. Por esta razón, las plantas han desarrollado múltiples mecanismos de adaptación y de protección al daño que pueda causar el exceso de luz, siendo estos mecanismos activados a diferentes niveles, permitiendo de esta forma una respuesta variada (Huner et al., 1998; Walters 2005; Eberhard et al., 2008).

Cuando ocurre un exceso de luz, el aparato fotosintético se daña y por lo tanto existen mecanismos que permiten la protección del mismo. El mecanismo de respuesta más rápido al exceso de luz es el quenching no-fotoquímico (NPQ), el cual consiste en la disipación térmica del exceso de energía absorbido, y es activado en segundos, luego de un cambio en las intensidades de luz (Genty et al., 1989; Niyogi 2000; Szabo et al., 2005). Se pueden identificar dos componentes principales en el NPQ, el quenching de energía (qE) y el quenching inhibitorio (qI). qE depende de la acidificación del lumen, se desarrolla en segundos luego del aumento de la intensidad de luz, y se relaja luego de 1-2 minutos de oscuridad (Demmig-Adams et al., 1996; Horton et al., 1996). qI es el componente más lento, y depende de más de un mecanismo. En parte, se desarrolla debido a la fotoinhibición del PSII, pero también por la acumulación de zeaxantina, la cual requiere de 1 hora para ser reconvertida en violaxantina, y contribuye con los componentes lentos del NPQ (Dall'Osto et al., 2005; Reinhold et al., 2008). Esta contribución de la zeaxantina se denominó recientemente como qZ, para distinguirla del componente fotoinhibitorio,

aunque se debe mencionar que la zeaxantina también contribuye con el aumento del componente qE (Horton et al., 1996; Nilkens et al., 2010; Forster et al., 2011; Jahns y Holzwarth 2012; Nichol et al., 2012).

En cuestión de minutos, una fuerte iluminación también activa la síntesis de zeaxantina a partir de violaxantina, mediante la activación de de-epoxidasa violaxantina (VDE) (Arnoux et al., 2009; Jahns et al., 2009). La zeaxantina, además de retardar la relajación del NPQ en la oscuridad, también juega un rol importante en atrapar ROS (Demmig-Adams et al., 1990; Niyogi y Björkman 1998; Havaux et al., 2007). A largo término, las plantas pueden responder a cambios en las intensidades de luz mediante la activación de una respuesta de aclimatación, la cual consiste en modular la expresión génica, el contenido proteico y las propiedades fisiológicas, de manera de sobrellevar las nuevas condiciones climáticas (Walters 2005; Eberhard et al., 2008). Como ejemplo de esto, se genera un aumento en la concentración de enzimas fijadoras de nitrógeno en las plantas aclimatadas a las altas intensidades de luz, lo cual permite una mejor explotación de la radiación disponible. Otra respuesta comúnmente observada en las plantas es la reducción del tamaño del PSII y del contenido de pigmento por área (Melis 1991; Bailey et al., 2001; Bailey et al., 2004; Ballottari et al., 2007).

Es interesante destacar que el NPQ ocurre tanto en plantas como en algas, pero su activación depende de diferentes productos génicos. Mientras que en plantas vasculares, la proteína PSBS (Photosystem II subunit S) es crucial, en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* se requiere de la presencia de otra proteína distinta, denominada LHCSR (Light harvesting complex stress-related) (Li et al., 2000; Peers et al., 2009).

Aunque la luz es una fuente de energía para los organismos fotosintéticos, el exceso de la misma causa un estrés oxidativo en las plantas. Tanto las plantas con semillas como las algas previenen la formación de ROS mediante la activación del NPQ, el cual disipa este exceso de energía como calor. Aunque el NPQ se encuentra tanto en plantas con semillas como en algas, estos organismos requieren de proteínas diferentes para su activación, LHCSR y PSBS, respectivamente. El genoma de *P.patens*, posee genes para ambas proteínas, y se ha demostrado que ambas proteínas están involucradas en NPQ (Alboresi et al., 2010). La respuesta NPQ en esta planta es crucial para evadir el daño al aparato fotosintético causado durante las exposiciones excesivas de luz (Gerotto et al., 2011).

Percepción y transducción de la señal de estrés

La señal del estrés tiene que ser percibida e interpretada por las diferentes células vegetales para así poder iniciar una transducción de la señal al mismo. La respuesta a un estrés se inicia cuando una planta reconoce este estrés a nivel celular. Este reconocimiento activa vías de transducción de señales que propagan la información no sólo en las células individuales sino también a través de toda la planta. Por último, los cambios en la expresión génica, los cuales ocurren a nivel celular, son integrados por la planta en una respuesta que puede modificar el crecimiento, el desarrollo e incluso

influenciar las capacidades reproductivas de las plantas. La duración y severidad de un estrés indicarán la magnitud y el tiempo de duración de dicha respuesta.

Se han propuesto dos tipos de sistemas de reconocimiento del estrés que dependen de la membrana de la célula vegetal, los cuales pueden describirse como sistemas dependientes del estado redox de la célula y aquellos dependientes de perturbaciones de las interacciones en la pared y membrana celular (Kacperska 2004). No hay duda de que en la célula vegetal tanto la pared, como la membrana y el citoesqueleto constituyen una entidad fuertemente integrada (Baluska et al., 2003). Por esta razón es que las alteraciones de las propiedades físicas en la membrana plasmática inducidas por el estrés, las cuales tienen como resultado modificaciones en la actividad de proteínas localizadas allí, son afectadas por la presencia y las propiedades de la pared celular.

Percepción y transducción de señales frente a factores de estrés abiótico

Se han identificado varias proteínas tipo receptores que están implicadas en los mecanismos de percepción de las señales generadas por el estrés abiótico. Entre estos se encuentran las proteínas tipo quinasas RLKs (*receptor like kinases*), los receptores de tipo histidina quinasas (como las que integran los sistemas de dos componentes) y receptores asociados a proteínas G.

En el genoma de las plantas se encuentra un gran número de RLK's, los cuales pueden dividirse en diferentes subgrupos de acuerdo a sus caracteres estructurales (Hardie 1999; Shiu y Bleecker 2001). En *A.thaliana* se encontró un gen que codifica para un receptor tipo quinasa con un repetido de leucinas extracelular llamado RPK1 (receptor-like kinase1), el cual se induce por deshidratación, bajas temperaturas, salinidad y tratamientos con ABA (Hong et al. 1997), y cuya sobreexpresión genera tolerancia al estrés salino (Shi et al., 2014).

El sistema basado en dos componentes que involucra histidinas quinasas fue inicialmente encontrado en procariontas para la percepción de varias señales ambientales, pero también se han encontrado en eucariotas, incluyendo en plantas. Un tipo de estos receptores es *AthK1* (Histidina quinasa de *A.thaliana*), la cual funciona como osmosensor (Urao et al., 1999; Hao et al., 2004).

Por último, en plantas existen receptores asociados a proteínas G (GPCR) que podrían participar en la percepción de diferentes estreses ambientales. Estas se encuentran involucradas en procesos como la señalización del ABA o de canales iónicos (Wang et al., 2001) y la modulación de la proliferación celular (Ullah et al., 2001) en *A.thaliana*. En esta planta se ha identificado solamente un gen que codifica para una GPCR (*GCR1*), el cual se ha demostrado se encuentra involucrado en la señalización del ABA en las células guarda (Pandey y Assmann 2004).

Una vez percibida la señal, las células generalmente pueden utilizar varias vías para la transducción de la misma, entre las que se encuentra la cascadas de fosforilación y desfosforilación proteica o las vías de las MAP quinasas. Una de las protein quinasas más estudiadas es *PKABA1*, el cual fue uno de los primeros genes que se demostró que se

regula positivamente por sequías, bajas temperaturas, NaCl y ABA (Holappa y Walker-Simmons 1995), e interactúa con elementos específicos de respuesta al ABA, fosforilándolos (Johnson et al., 2002).

Otra familia de protein quinasas únicas en plantas son las protein quinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), las cuales se encuentran también involucradas en la respuesta al estrés. Las CDPKs están compuestas por un dominio Ser/Thr quinasa y un dominio tipo calmodulina en el extremo C-terminal. La mayoría de las CDPKs tienen en su extremo N-terminal un motivo de miristilación, el cual facilita su asociación con las membranas. La expresión de *AtCDPK1* y *AtCDPK2* en *A.thaliana* es rápidamente inducida por sequías y tratamientos con sal, mientras que no se inducen por bajas temperaturas, shock térmico o ABA, sugiriendo que podrían participar en vías de transducción independientes de ABA (Urao et al., 1994).

En una cascada de señalización de estrés, la inactivación de fosfoproteínas viene generalmente acompañada por desfosforilación. Hay 4 grupos de fosfatasas: PP1, PP2A, PP2B (calcineurina) y PP2C (Xiong y Zhu, 2001). Las fosfatasas PP1 o PP2A actúan como reguladores positivos y negativos en la vía de transducción de la señal del ABA (Schmidt et al., 1995; Esser et al., 1997; Grabov et al., 1997; Hey et al., 1997; Pei et al., 1997; Wu et al., 1997; Rodriguez 1998; Zhang et al., 2013; 2014; Singh et al., 2015). PP2B y PP2C son dependientes de Ca^{2+} , mientras que PP1 y PP2A no necesitan de Ca^{2+} para sus funciones. El Ca^{2+} transmite la señal primaria en una respuesta celular, como la expresión génica, mayormente a través de proteínas reguladas por Ca^{2+} , entre las cuales se incluyen los sensores de Ca^{2+} y sus blancos. Los sensores de Ca^{2+} vegetales más importantes incluyen a la calmodulina (CaM) (Zielinski, 1998; Snedden y Fromm, 2001; Luan et al., 2002), una protein quinasa que contiene dominios CaM (CDPKs-calcium-dependent protein kinase) (Harmon et al., 2000; Sanders et al., 2002), y una proteína tipo calcineurina B recientemente descubierta (CBLs) (Luan et al., 2002).

Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona vegetal que regula muchos aspectos importantes del desarrollo de las plantas, entre los cuales se encuentran la síntesis de lípidos y proteínas de reserva de las semillas, la regulación de la inducción de la dormancia de las semillas (inhibe la germinación precoz de embriones inmaduros promoviendo la dormancia de las semillas), y la inhibición de la transición desde la fase embrionica a la germinativa y de la vegetativa a la reproductiva (Leung y Giraudat, 1998; Rock 2000; Rohde et al., 2000). Además de esto, el ABA media una serie de respuestas fisiológicas al estrés ambiental tales como el cierre de los estomas inducido por estrés osmótico o por deshidratación, la inducción de la tolerancia al estrés hídrico, salino, por calor o por hipoxia, y la respuesta a las heridas o a patógenos (Leung y Giraudat, 1998; Rock 2000; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Se han identificado una serie de genes regulados por ABA (Busk y Pages, 1998; Rock, 2000), muchos de los cuales se encuentran involucrados en la respuesta a factores de

estrés abiótico que tienen como consecuencia la deshidratación de las células (Ingram y Bartels, 1996; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Xiong et al., 2002).

El ABA está involucrado en la inhibición de la apertura y en la inducción del cierre de los estomas. La apertura y cierre del poro de las células guarda es el resultado de la variación osmótica de estas células. En condiciones de estrés hídrico, el aumento de ABA celular o en el apoplasto de las células guarda, provoca una disminución en la presión de turgencia de estas células, la cual produce al cierre de los estomas impidiendo la salida de agua por transpiración. A su vez, el ABA regula la transcripción de numerosos genes que codifican proteínas con funciones de protección celular.

Percepción del ABA

A través de aproximaciones por genética directa se han identificado receptores de hormonas, es decir mediante la identificación de mutantes con fenotipos insensibles. En el caso del ABA, el screening fenotípico más utilizado es la inhibición de la germinación de las semillas mediante la aplicación de ABA exógena. Mediante esta metodología se han identificado varios mutantes insensibles al ABA (Koomneef et al., 1984; Finkelstein 1994), cinco de los cuales han sido caracterizados y estudiados intensamente, denominados *abi1-abi5*. Los genes *ABI1* y *ABI2* codifican para proteínas PP2Cs (Meyer et al., 1994; Leung et al., 1994; Leung et al., 1997), mientras que los genes *ABI3*, *ABI4* y *ABI5* codifican para factores de transcripción involucrados en las vías de señalización del ABA en semillas (Parcy et al., 1994; Finkelstein et al., 1998; Finkelstein y Lynch 2000). Ninguno de los genes identificados mediante aproximaciones de genética clásica tienen propiedades de unión al ABA o de receptores de ABA. A pesar de una extensa búsqueda, los receptores de ABA se habían restringido solamente a aquellos basados en evidencia circunstancial. Sin embargo, mediante el uso de aproximaciones alternativas se reportaron cuatro tipos de posibles receptores de ABA los que incluyen a una proteína controladora de la floración (FCA) (Razem et al., 2006), la subunidad H Mg-quelatasa (CHLH) (Shen et al., 2006), un receptor acoplado a una proteína G denominado GCR2 (Liu et al., 2007) y GTG1 y GTG2 (Pandey et al., 2009).

La identificación de receptores capaces de sensar y traducir la señal del ABA a otros mediadores ha sido muy controversial y frustrante. Desde el año 2006, se han reportado varios artículos científicos donde se han identificado receptores de ABA (McCourt y Creelman, 2008), sin embargo, ninguno de estos reportes pudieron ser sostenidos luego de nuevas investigaciones. Pero en el 2009, finalmente se dieron a conocer dos descubrimientos paralelos convincentes, donde se describieron candidatos de receptores de ABA pertenecientes a la familia de las proteínas PYR/PYL/RCAR (Park et al., 2009; Ma et al., 2009; Santiago et al., 2009). En *A.thaliana*, los 14 miembros pertenecientes a este grupo de proteínas se denominan Pyrabactin Resistance 1 (PYR1) y PYR1-like 1-13 (PYL1-PYL13) (Park et al., 2009) o Componente Regulatorio de Receptores de ABA (RCAR1-RCAR14) (Ma et al., 2009). El descubrimiento de estas proteínas PYLs, llevaron a estudios de cristalografías, los cuales revelaron en detalle el mecanismo de reconocimiento y

transducción de la señal de esta hormona a través de estos receptores. Desde entonces, mediante múltiples estudios estructurales, se han aclarado las interacciones moleculares que comprenden las vías de señalización del ABA, las cuales consisten en cascadas de señalización de PYL, proteínas fosfatasa de tipo 2C (PP2Cs) y proteínas quinasas relacionadas a Snf1 (SnRK2s). En ausencia de PP2Cs, PYL9 y PYL5 se unen al ABA, mientras que en presencia de PP2C, la afinidad por las mismas aumenta hasta más de 10 veces. Esto podría sugerir que las proteínas PYR/PYL/RCAR y PP2Cs podrían actuar como co-receptores. Otros estudios determinaron la estructura de la unión de estos receptores con el ABA, demostrando que estos complejos tienen un estequiometría de 1:1 (Melcher et al., 2009). Mediante mapas de densidad electrónica de alta resolución se pudo demostrar que el ABA se encuentra dentro de un "bolsillo", con su cadena de hidrocarburos y anillo ciclohexeno dentro de la estructura hidrofóbica de PYL2 (Melcher et al., 2009).

Intermediarios de la señal

Se han detectado varias quinasas implicadas en la señalización del ABA que afecta la regulación del estoma y/o la expresión de diversos genes.

La proteína fosfatasa 2C (PP2C) es uno de los componentes más estudiados de la vía de señalización del ABA (Gosti et al., 1999; Sheen 1998). La identificación de los loci insensibles a ABA, *ABI1* y *ABI2*, los cuales codifican PP2Cs, generaron información acerca de la importancia de PP2C y los eventos de fosforilación de proteínas en las vías de señalización del ABA (Finkelstein et al., 2002). PP2C son un grupo de fosfatasa Ser/Thr que contienen una subunidad dependiente de Mg^{2+}/Mn^{2+} , y representan la familia de fosfatasa más abundante en plantas. De las 112 fosfatasa codificadas en el genoma de *A.thaliana*, 76 son PP2Cs, las cuales se agrupan en 10 grupos (A-J), con la excepción de 6 genes que no pudieron ser agrupados (Schweighofer et al., 2004). Se ha demostrado que al menos 6 de los 9 miembros del grupo de PP2C A están involucrados en la señalización del ABA.

La identificación de PP2Cs indica que los eventos de fosforilación de proteínas son importantes en la señalización del ABA. En este sentido, se identificaron proteínas quinasas activas, pertenecientes a la familia SnRK2 (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002). SnRK2 pertenece al grupo de proteínas quinasas SnRK, las cuales se encuentran relacionadas a la proteína de levadura Snf1 y a la subunidad catalítica de la proteína de mamíferos AMPK. El genoma de *A.thaliana* contiene 38 proteínas SnRKs las cuales están divididas en 3 grupos, denominados, SnRK1 (1.1-1.3), SnRK2 (2.1-2.10) y SnRK3 (3.1-3.25) (Hrabak et al., 2003).

El grupo SnRK1 comparte el mayor porcentaje de homología con Snf1 y AMPK. De manera similar a estas proteínas de levadura y mamíferos, SnRK1 es conocida por tener un rol clave como regulador metabólico (Polge y Thomas, 2007). Por el contrario, SnRK2 y SnRK3 son proteínas únicas de plantas, y se piensa están involucradas en la señalización del estrés abiótico (Coello et al., 2011). En *A.thaliana* existen 10 miembros de la familia SnRK2, los cuales se encuentran divididos en 3 subclases: I, II y III. Todos estos

miembros, con excepción de SnRK2.9, pueden ser activados por el estrés osmótico (Boudsocq et al., 2004), ya que el mutante nulo en estas 10 proteínas es sensible a este tipo de estrés (Fujii et al., 2011). Sin embargo, no todas las SnRK2 pueden ser activadas por ABA, lo cual indica que existen dos vías de señalización del estrés osmótico, una dependiente y otra independiente de ABA. Mientras que los miembros de la subclase I de SnRK2 no se activan por ABA, los miembros de la subclase III si lo hacen, y los de la subclase II (SnRK2.7 y SnRK2.8) tienen una activación más leve (Boudsocq et al., 2004).

Activación de genes de respuesta

La acumulación de ABA en las células vegetales produce cambios en la expresión de genes, los cuales contribuyen a la tolerancia al estrés. Estudio de transcriptoma realizados en *A.thaliana* y arroz mostraron que la exposición al ABA y a tratamientos con estrés abiótico resultan en cambios en aproximadamente 5-10% de los genes en el genoma, de los cuales la mitad de estos genes son comunes entre los tratamientos con ABA, estrés por deshidratación y estrés salino (Nakashima et al., 2009; Shinozaki et al., 2003). Entre las proteínas codificadas por los genes inducidos por ABA involucrados en la tolerancia al estrés se encuentran: dehidrininas, miembro de la familia de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), y las cuales tienen posibles funciones como chaperonas estabilizando membranas y protegen otras proteínas de la agregación; enzimas detoxificantes de especies reactivas de oxígeno (ROS); y proteínas reguladoras como factores de transcripción, proteínas fosfatasa y proteínas quinasas (Finkelstein et al., 2002; Himmelbach et al., 2003; Kuhn y Schroeder 2003). Por otro lado, también se reprime la expresión de genes, sobre todo aquellos que se encuentran involucrados en la traducción de proteínas de crecimiento de las células.

Se han comparado las regiones promotoras de varios genes inducidos por ABA, y se encontró en todos ellos la existencia de una secuencia conservada PyACGTGGC, la cual se denominó elemento de respuesta a ABA (ABRE) (Menkens et al., 1995). Esta secuencia fue encontrada en el gen *Em* de trigo, el cual se expresa en las semillas durante la embriogénesis tardía, y en el gen *RAB16* de arroz el cual es expresado tanto en los tejidos vegetativos como en las semillas en maduración (Guiltinan et al., 1990; Mundy et al., 1990; Yamaguchi- Shinozaki y Shinozaki, 2005). Este elemento ABRE que actúa en *cis* es fundamental en la expresión génica mediada por ABA. Son reconocidos por proteínas con dominios básicos de cremallera de leucina (bZIP) denominadas proteínas de unión a ABRE (AREB/ABF).

Rol del ABA en plantas no vasculares

Hasta hace unos años, se pensaba que ABI3 actuaba solamente durante el desarrollo de las semillas, específicamente como componente de la vía de señalización del ABA involucrado en la maduración y germinación de las mismas (Giraudat et al., 1992; McCarty et al., 1991; Nambara et al., 1995, 2000; Parcy et al., 1997). Sin embargo, desde hace un tiempo se sabe que ABI3 también podría tener una función fuera de las semillas, como por ejemplo en el desarrollo de los plastidos, el control de la floración, y el crecimiento de los

meristemas (Rohde et al., 2000). Estos análisis también revelaron que existe una interacción entre el ABA y las auxinas en la germinación de las semillas y en la formación de las raíces laterales en *A.thaliana* (Brady et al., 2003; Suzuki et al., 2001). Estos datos indican que ABI3 no solamente se encuentra involucrado en la regulación del desarrollo y de la germinación de las semillas, sino también en el crecimiento vegetativo.

Experimentos realizados por Knight y colaboradores (1995) sugieren que las vías de señalización dependientes de ABA se encuentran conservadas entre plantas vasculares y no vasculares. Estos autores demostraron que si se coloca un gen reportero bajo el control de los elementos promotores del gen *Em* de trigo en el musgo *P.patens*, éste es inducido por ABA y por estrés osmótico. Esto sugiere que las plantas superiores y *P.patens* comparten componentes regulatorios del ABA en común, lo cual podría contribuir a elucidar los mecanismos involucrados en las respuestas al ABA. Además, se ha descrito la presencia de un gen homólogo al gen *Em* de trigo en *P.patens*, denominado *PpLEA1*, el cual se encuentra altamente inducido por ABA (Kamisugi y Cumming 2005). En el año 2006, Marella y colaboradores publicaron que *P.patens* y *A.thaliana* tienen vías de señalización conservadas del ABA, mediada por las proteínas fosfatasa PP2C ABI1 (Leung et al., 1997; Komatsu et al., 2009) y el factor de transcripción ABI3 (Giraudat et al., 1992). Además, el gen *PpABI3-A* de *P.patens* es capaz de complementar parcialmente el fenotipo de las plantas mutantes de *A.thaliana abi3-6* (Nambara et al., 1994). Además, *P.patens* también posee 4 genes que codifican para SnRK2, y que codifican para los receptores PYR/PYL/RCAR (Takezawa et al., 2011).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que el ABA aumenta la tolerancia a diferentes condiciones de estrés en plantas superiores. En *P.patens*, se ha observado que el tratamiento previo con ABA aumenta la tolerancia al frío (Minami et al., 2003) y a la deshidratación (Khandelwal et al., 2010).

Genes inducidos por estrés

La variación genética de las plantas contribuye a la tolerancia fisiológica al estrés, mediante la regulación de procesos fisiológicos tales como, el control de la homeostasis celular y del crecimiento, la regulación hormonal, el ajuste osmótico y el control del daño celular (Zhu 2002).

Las proteínas codificadas por los genes que responden al estrés abiótico pueden actuar en distintos aspectos de la respuesta adaptativa de la planta (Bohnert et al., 1995; Ingram y Bartels 1996; Bray 1997; Shinozaki et al., 1999; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000).

Los genes y proteínas asociadas al estrés pueden clasificarse en dos grandes grupos, uno de los cuales estaría constituido por proteínas funcionales o por proteínas que actúan directamente en la tolerancia al estrés, y otro grupo formado por proteínas reguladoras, o sea factores involucrados en la regulación de transducción de señales y en la expresión de genes responsables de la respuesta al estrés. Entre las principales proteínas que se encuentran dentro del primer grupo están la familia de proteínas LEA (*Late Embryogenesis abundant*), las proteínas de Heat shock (HSPs), los genes inducidos por frío (*kin*),

proteínas relacionadas con la biosíntesis de osmoprotectores y del metabolismo de carbohidratos, proteínas involucradas en el transporte de agua, azúcares y potasio a través de la membrana plasmática, enzimas detoxificantes, proteasas, proteínas de transferencia de lípidos, entre otras (Wang et al., 2004; Park et al., 2004; Apse y Blumwald 2002; Rontein et al., 2002). En el segundo grupo se encuentran las proteínas quinasas, fosfatasas, enzimas del metabolismo fosfolipídico, moléculas de señalización, factores de transcripción, entre otros (Zhang et al., 2004; Shou et al., 2004; Qiu et al., 2002; Thiery et al., 2004).

Entre los numerosos genes de respuesta al estrés abiótico que participan directamente en la tolerancia, las HSP y la familia de proteínas LEA son por lejos las más abundantes y estudiadas en plantas en el contexto de las respuestas al estrés abiótico en plantas (Wang et al., 2003; 2004). Se propone que estas proteínas ayudarían a proteger la célula vegetal del estrés, controlando la correcta formación de las proteínas tanto estructurales (por ejemplo de la membrana celular) como funcionales (por ejemplo enzimas).

Dehidrinas

Las proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*) se acumulan predominantemente durante la desecación de las semillas y en los tejidos deshidratados (Roberts JK et al. 1993). Las dehidrinas (DHNs) pertenecen al grupo II de la familia de proteínas LEA. Además de acumularse durante los últimos estadios de la embriogénesis, las dehidrinas también se acumulan en respuesta a bajas temperaturas, ABA exógeno, o cualquier influencia ambiental que tenga un componente de deshidratación, como por ejemplo, salinidad, frío o temperaturas de congelamiento. Debido a la alta expresión de las proteínas LEA en condiciones de deshidratación, se sugiere que la función de estas proteínas es la de prevenir el daño celular causado por el estrés hídrico (Labhili et al., 1995; Close 1996; Borovskii et al., 2002; Jiang y Huang 2002).

Las DHNs no presentan homología con ninguna otra proteína de función conocida. Muchas de estas proteínas comparten una composición aminoacídica básica, ricas en alaninas y glicinas y todas ellas carecen de cisteínas y triptófanos. La característica que define una DHN es la presencia de un segmento de aminoácidos rico en lisinas, que se ubica generalmente en el extremo C-terminal de las proteínas. Este segmento, denominado K (EKKGIMDKIKELLPG), está conservado tanto en las DHNs de plantas superiores como de plantas inferiores, y se postula que puede adoptar una conformación de tipo alfa-hélice anfipática, lo cual sería importante para la función de estas proteínas (Close 1996). El segmento K, junto con otros dos segmentos menos conservados, denominados S (segmento rico en serinas) e Y (T/VDEYGNP), se combinan de distintas formas dando lugar a un amplio variedad de DHNs. En base a la presencia de estos segmentos y a las repeticiones de los mismos en las proteínas se distinguen los cinco tipos de dehidrinas estructuralmente diferentes en plantas superiores: YnSKn; SKn; Kn; YnKn y KnS (Hanin et al., 2011).

Se ha postulado algunas funciones para estos segmentos conservados. El segmento K, por ejemplo, podría cumplir un rol en la interacción hidrofóbica con proteínas o membranas parcialmente desnaturalizadas (Close 1996), convirtiendo a las dehidrinas en agentes solubilizantes con propiedades de detergentes y chaperonas.

Este tipo de proteínas también pueden presentar otro dominio, menos conservado, denominado segmento Φ , el cual es rico en aminoácidos polares y puede tener variaciones considerables entre proteínas.

Distribución y localización subcelular

Se ha estudiado la distribución de varias DHNs en tejidos de diferentes especies de plantas mediante estudios inmuno-histoquímicos. La dehidrina P-80 expresada en cebada aclimatada a las bajas temperaturas, se encontró que se localiza, además de en el tejido vascular y en la epidermis de las raíces, en las hojas no aclimatadas del haz vascular (Bravo et al., 1999). En 1993 Schneider y colaboradores analizaron la localización de la dehidrina DSP16 en *C.plantagineum* en condiciones de deshidratación. Esta dehidrina se pudo localizar en todos los tipos celulares, pero preferentemente en las células ricas en citoplasma como, por ejemplo, los elementos en tubo del floema de las hojas y las células embrionarias de las semillas. Una DHN de zanahoria, ECP40, fue localizada en el endosperma y en embriones cigóticos de semillas (Kiyosue et al., 1993). Las proteínas de la familia de las DHNs WCS120 se localizaron principalmente en el haz vascular y bordeando las células del parénquima de los tejidos del trigo aclimatado a las bajas temperaturas (Houde et al., 1995). Otra dehidrina encontrada en trigo, WCOR410, también se encontró que se acumula preferentemente en el área de transición vascular (Danyluk et al., 1998), mientras que RAB17 de maíz fue localizada en todos los tipos celulares de embriones maduros y en la capa de aleurona (Asghar et al., 1994; Godoy et al., 1994).

En cuanto a la localización subcelular, se ha visto que las DHNs se localizan en diferentes compartimentos, entre los cuales se incluye el citosol, núcleo, vacuola, mitocondria, y la vecindad de la membrana plasmática (Houde et al., 1995; Rorat et al., 2004; Danyluk et al., 1998; Egerton-Warburton et al., 1997; Borovskii et al., 2000; Heyen et al., 2002). Además, un estudio reciente demostró que una dehidrina de un helecho tolerante a la desecación tiene una posible localización en la pared celular durante condiciones de deshidratación (Layton et al., 2010). El segmento S está involucrado en la localización nuclear debido a sus residuos de serina, blancos de fosforilación (Godoy et al., 1994; Jensen et al., 1998; Plana et al., 1991; Lisse et al. 1996). En resumen, las DHNs parecen estar presentes o estar asociadas a la mayoría de los compartimentos celulares, y sus localizaciones pueden ser alteradas por modificaciones postraduccionales como por ejemplo fosforilaciones.

Los genes codificantes para DHNs pertenecen a familias grandes, integrado por 2 a 13 o más genes en las diferentes especies. Se ha visto que algunos de estos genes se encuentra regulado diferencialmente durante el desarrollo o luego de un tratamiento con estrés (Svensson et al., 2002; Tommasini et al., 2008). Las DHNs se acumulan durante la

deshidratación en los estadios tardíos del desarrollo de las semillas y en los tejidos vegetativos que se encuentran bajo condiciones de estrés ambiental extremo como la deshidratación, bajas temperaturas, salinidad o luego de tratamientos con ABA (Close 1997; Godoy et al., 1994; Houde et al., 1995; Danyluk et al., 1998; Ingram y Bartels 1996; Allagulova et al., 2003; Lisse et al., 1996; Ismail et al., 1999; Nylander et al., 2001; Bravo et al., 1999; Saavedra et al., 2006). Se ha demostrado que algunas DHNs también se acumulan bajo condiciones normales en algunos tejidos específicos, como por ejemplo el ápice de la raíz, en los estomas abiertos, y en las células que rodean los tejidos vasculares, lo cual sugiere un rol de estas proteínas durante el crecimiento normal de la planta (Rorat et al., 2004; 2006; Houde et al., 1995; Nylander et al., 2001).

Función

A pesar de los numerosos estudios sobre estas proteínas, no está claro aún qué función cumplen en la respuesta al estrés. Algunos estudios bioquímicos han sugerido que estas proteínas podrían actuar como estabilizadores de proteínas o de membranas (Close 1996; 1997; Rorat et al., 2006; Koag et al., 2003; Danyluk et al., 1998), como scavengers de radicales protegiendo lípidos de peroxidación (Hara et al., 2003), o como chaperonas previniendo la agregación de proteínas o de enzimas luego del estrés (Kovacs et al., 2008; Goyal et al., 2005).

Aunque se asume que las DHNs juegan un rol importante en la tolerancia al estrés por agua, existen muy pocas evidencias directas que avalen esta función en plantas. Existen estudios que muestran una correlación positiva entre la acumulación de DHNs y el grado de tolerancia al estrés abiótico (Svensson et al., 2002; Hu et al., 2010; Weiss y Egea-Cortines 2009). Además de esto, análisis de plantas transgénicas que sobreexpresan uno o varios genes que codifican DHNs, mostraron que algunos miembros de esta familia se encuentran involucrados en la tolerancia a la salinidad, al estrés osmótico o al congelamiento (Hara et al., 2003; Brini et al., 2007; Puhakainen et al., 2004; Shekhawat et al., 2011). Sin embargo, la redundancia de esta familia génica en plantas superiores ha obstaculizado la elucidación de la función precisa de estas proteínas mediante aproximaciones genéticas.

La primera evidencia genética sobre el rol de una dehidrina en la tolerancia al estrés fue aportada por nuestro grupo en un trabajo que demuestra que el *knockout* de la dehidrina PpDHNA de *P.patens* afecta notoriamente la recuperación de las plantas de un estrés osmótico o salino (Saavedra et al., 2006).

Proteínas de Heat shock

El estrés hídrico, salino o por bajas o altas temperaturas, comparten algunas respuestas que son similares entre ellos (Zhu 2002; Yu et al., 2008; Krasensky y Jonak 2012). La disrupción de la homeostasis celular producido por la exposición a estos tipos de estrés generan una disfunción proteica, por lo que las células deben emplear mecanismos eficientes que permitan que las proteínas mantengan su conformación funcional o que

eviten que las mismas sean desnaturalizadas o agregadas. Entre las respuestas más conservadas en todos los seres vivos al estrés por altas temperaturas, está la expresión de proteínas de heat shock (HSPs) (Gurley 2000; Hong y Vierling 2000; 2001; Malik et al., 1999; Prandl et al., 1995; Queitsch et al., 2000), las cuales se acumulan tanto en las células procariotas como eucariotas. De acuerdo a su peso molecular, las HSPs se dividen en cinco grupos o clases diferentes: HSP100s, HSP90s, HSP70s, HSP60s y HSP20s, estas últimas también llamadas heat shock pequeñas o sHSPs (Trent, 1996). La mayoría de las HSPs tienen función de chaperonas, actuando en el mantenimiento de la homeostasis del plegamiento de las proteínas suprimiendo la agregación de éstas, en la adquisición de la termotolerancia y protegiendo a la célula del estrés (Scharf et al., 2001; Forreiter et al., 1997; Lee et al., 1997; Heckathorn et al., 1998; Low et al., 2000; Vierling 1991). La acumulación de HSPs cumplen un rol importante en la respuesta al estrés abiótico en plantas (Sun et al., 2002; Sorensen et al., 2003; Wang et al., 2004). El efecto de protección de las HSPs puede estar atribuido a la maquinaria de chaperonas, en la cual diferentes HSPs actúan en cooperación (Wang et al., 2004). Por otra parte, se ha reportado una elevada expresión de HSPs en respuesta a otros estímulos de estrés, como al estrés oxidativo (Banzet et al., 1998; Lee et al., 2000), durante la aclimatación al frío (Anderson et al., 1994), deshidratación (Campbell et al., 2001; Liu et al., 2006), altas concentraciones de sal (Liu et al., 2006), tratamientos con ABA (Campbell et al., 2001; Ruibal et al., 2013) y por daño mecánico y tratamientos con ácido salicílico (Chang et al., 2007; Ruibal et al., 2013). Además, en ausencia del estrés se ha demostrado que la expresión de algunas HSPs está regulada durante el desarrollo de las plantas (Howarth 1990; Zarsky et al., 1995; Wehmeyer et al., 1996; Reddy et al., 1998; Haralampidis et al., 2002; Volkov et al., 2005).

Las sHSPs son una familia diversa de proteínas inducidas por estrés, las cuales tienen un peso molecular que varía entre 12-42 kDa, y se definen por la presencia de un dominio carboxi-terminal conservado, denominado alfa-cristalino (de Jong et al., 1998). La familia de sHSP vegetales es más compleja que la de otros organismos (Scharf et al., 2001). Por ejemplo, el genoma de *A.thaliana* codifica para 19 sHSPs, que se dividen en subfamilias de acuerdo a su localización subcelular (Scharf et al., 2001). En angiospermas existen 11 subfamilias que incluyen la mayoría pero no todas las sHSPs, 6 de las cuales son de localización citosólica/nuclear (CI-CVI), mientras que las otras 5 se encuentran localizadas en otros organelos: retículo endoplásmico, peroxisomas, cloroplastos y mitocondrias (Scharf et al., 2001; Bondino et al., 2012; Waters 2013). Se ha visto que las sHSPs de plantas se acumulan en respuesta a un amplio rango de factores de estrés, como calor, deshidratación, salinidad, bajas temperaturas y estrés oxidativo (Scharf et al., 2001; Löw et al., 2000; Sabehat et al., 1998; Asada 1994; Almoquera et al., 1993; Alamillo et al., 1995; Harndahl et al., 1999; Hamilton y Heckathorn 2001; Ruibal et al., 2013).

Se ha reportado que las sHSP se pueden acumular en forma de granulos (HSG), formados por complejos citosólicos de gran tamaño, con un peso molecular entre 1-2 Mda, presentes en todos los tejidos vegetales durante los tratamientos con altas temperaturas (Nover et al., 1989). Este fenómeno ha sido descrito solamente en plantas. Estas

estructuras pueden estar formando grandes complejos citosólicos de heat shock (HSC), entre las cuales se involucran sHSPs de clase I-III, como también HSPs de mayor tamaño molecular, como por ejemplo HSP70 y HSP40 (Siddique et al., 2008). Los HSG pueden acumularse en un core básico, donde las sHSPs unen e incorporan proteínas desnaturalizadas, las cuales se acumulan en HSC para su renaturalización mediante las HSP de mayor peso molecular.

Heat Shock Factors

La expresión de las sHSPs se encuentra controlada por los factores de transcripción de heat shock (HSFs), los cuales se unen a motivos palindrómicos conservados denominados elementos de heat stress (HSEs) (Wu 1995; Schoffl et al., 1998; Pelham 1982).

Se sabe que algunos HSFs funcionan como sensores moleculares de peróxido, los cuales responden a las alteraciones en los niveles de ROS durante el estrés mediante cambios conformacionales y formación de multímeros, lo cual conlleva a una activación transcripcional de sus genes blanco (Miller y Mittler 2006). ROS se acumulan en respuesta al estrés biótico y abiótico, y actúan como moléculas señal en las vías de aclimatación al estrés (Foyer y Noctor 2005; Miller et al., 2010; Suzuki et al., 2012). La generación de ROS, en particular de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante el estrés por altas temperaturas o el estrés oxidativo median la activación de varios HSFs y por ende, la inducción de sus genes blanco (Miller y Mittler 2006; Volkov et al., 2006; Kotak et al., 2007). Algunos HSFs específicos se encuentran involucrados en la señalización de componentes claves de la vía de señalización de ROS, entre los cuales se incluyen proteínas quinasas mitogen-activated (MAP), como MPK3 y MPK6, y miembros de la familia de factores de transcripción en dedos de zinc, por lo que también contribuyen al control transcripcional de una larga batería de genes de respuesta al estrés oxidativo (Davletova et al., 2005; Miller y Mittler 2006; Pucciariello et al., 2012; Evrard et al., 2013). Dada la redundancia considerable de los genes que codifican para HSFs en *A.thaliana*, existen muy pocos mutantes en este tipo de genes con fenotipos identificables (Scharf et al., 2012). Debido a esto, la mayoría de los datos funcionales que existen son basados en la sobreexpresión o en la combinación con múltiples mutantes de HSFs (Liu et al., 2011). Basado en estos estudios, la subfamilia HSFA1 esta definida como regulador de la respuesta al estrés por altas temperaturas (Mishra et al., 2002; Liu et al., 2011), mientras que se propone que HSFA2, el cual se encuentra también inducido por altas intensidades de luz y por estrés oxidativo y osmótico, actuaría en múltiples vías de señalización al estrés (Nishizawa et al., 2006; Banti et al., 2010). HSFA1 y HSFA2 forman heterodímeros, los cuales resultan en la activación sinérgica de genes blanco (Chan-Schamnet et al., 2009). Por otro lado, se vio que la sobreexpresión de HSFA2 confiere tolerancia a varios estímulos (Banti et al., 2010). HSFA3 se activa mediante la proteína de unión a elementos de respuesta a la deshidratación A2, la cual se encuentra involucrada en la coordinación de la señalización al estrés por deshidratación y por calor, y la activación de genes de respuesta a ambos tipos de estrés (Sakuma et al., 2006; Yoshida et al., 2008). La función del grupo HSFA4 no se conoce todavía, pero se sabe que esta proteína de maíz y de arroz

aumentan la tolerancia al cadmio (Shim et al., 2009). También se ha demostrado que HSFA4 de tomate activa genes de respuesta al estrés por calor, y que interactúa con HSFA5, generando hetero-oligómeros inactivos.

Función de sHsps

El mecanismo específico por el cual las proteínas sHSPs protegen a la célula del daño del estrés no está completamente claro. Sin embargo, en los últimos años varios estudios han contribuido con modelos provenientes de estudios *in vitro*, que proponen que estas proteínas tienen la capacidad de estabilizar y prevenir la agregación de proteínas no nativas mediante su interacción hidrofóbica (Waters 2013; Lee et al., 1997; Ehrnsperger et al., 1997; Veinger et al., 1998; Lee y Vierling 2000; Reddy et al., 2000; Nakamoto y Vigh 2007). Aunque se asume que las sHSPs estarían directamente involucradas en la tolerancia al estrés abiótico en plantas, mucha de la información que hoy en día se encuentra disponible está basada en ensayos *in vitro*, debido a los pocos mutantes *knockout* específicos en genes sHSPs que existen.

- *sHSPs como chaperonas*

Las HSPs son conocidas por su función como chaperonas moleculares. Esta actividad chaperona fue corroborada en el año 2000 por el grupo de Low y colaboradores, donde demostraron que Hsp17.7 y Hsp17.3 de *A.thaliana* estabilizan la actividad de la luciferasa in vivo bajo condiciones de estrés térmico.

Específicamente, este tipo de proteínas previene la agregación irreversible de proteínas (Lee et al., 1995; Boston et al., 1996; Buchner 1996; Hartl 1996; Dobson 2003; Basha et al., 2004; Liberek et al., 2008; Saibil 2008; McHoaurab et al., 2009; Tyedmers et al., 2010; Hilario et al., 2011; Hilton et al., 2013). Se ha visto que las sHSPs son las primeras en la línea de defensa de las células cuando las proteínas comienzan a mal plegarse (Hilton et al., 2013). Todavía queda mucho por determinar acerca de los detalles específicos de las interacciones entre estas proteínas y sus proteínas sustratos, pero en los últimos años se ha avanzado mucho en modelos que muestran cómo las HSP actúan tanto individual como en conjunto (Dobson 2003; Liberek et al., 2008; Saibil 2008; Eyles y Gierasch 2010; Tyedmers et al., 2010).

Varios aspectos de los actuales modelos de las funciones de las sHSPs derivan de estudios en plantas y cianobacterias (Nakamoto y Vigh 2007).

El modelo actual de cómo funcionan las sHSP como chaperonas celulares sugiere que estas proteínas trabajan en conjunto con otras moléculas chaperonas, previniendo así la agregación y resolubilizando proteínas que habían sido agregadas.

Existen dos aspectos funcionales de las sHSP que las diferencia de otras HSP con función chaperonas, por un lado, no requieren de ATP para unirse a proteínas sustratos, y por otro, tienen una muy alta capacidad para unirse a sustratos desnaturalizados (Haslbeck et al., 2005; Nakamoto y Vigh 2007; McHaourab et al., 2009; Eyles y Gierasch 2010; Tyedmers et al., 2010), pudiendo unirse a una proteína sustrato de casi el mismo peso

molecular. Se piensa que esto pueden realizarlo exponiendo su superficie hidrofóbica (Nakamoto y Vigh 2007).

Todavía no se conoce con exactitud cómo las sHSP reconocen a sus sustratos desnaturalizados. Varios estudios mediante aproximaciones proteómicas en diferentes organismos han identificado un número significativo de proteínas citosólicas asociadas con o mediante sHSPs solubles bajo condiciones de estrés por altas temperaturas (Bepperling et al., 2012; Haslbeck et al., 2004; Basha et al., 2004; Fu et al., 2013; Peschek et al., 2013). En estos estudios se pudo demostrar que las mayoría de las proteínas identificadas como posibles sustratos *in vivo* de las sHSPs durante el estrés en bacterias son proteínas relacionadas a la transcripción (como por ejemplo proteínas ribosomales, factores de transcripción y tRNA sintetas) y enzimas metabólicas (Bepperling et al., 2012; Fu et al., 2013; Fu 2014). Sin embargo, todavía se desconoce qué regiones de las proteínas sustratos son las que se unen a las sHSPs o si existen motivos de reconocimiento en común. En términos de la relación sHSP:sustrato, las sHSPs son menos efectivas en suprimir la agregación de proteínas de gran tamaño, indicando que la interacción depende más de la masa que de la relación molar, lo cual derivaría en una captura dependiente de la carga o de la hidrofobicidad de los sustratos (Basha et al., 2012). Mientras que los motivos de reconocimiento de las sHSPs que se encuentran involucrados en la interacción con el sustrato es todavía enigmático, se piensa que existen varios sitios de unión que actuarían en conjunto, presumiendo que diferentes sitios se unirían a diferentes sustratos.

- *sHSPs en la tolerancia al estrés*

Aunque se asume que las sHSPs están directamente involucradas en la tolerancia al estrés abiótico en plantas, mucha de la información disponible hasta el momento esta basada en ensayos *in vitro*, ya que el pequeño tamaño de estos genes ha dificultado la identificación de mutantes nulos, impidiendo así el análisis funcional de los mismos por genética reversa. Sin embargo, varios estudios de sobreexpresión en plantas de sHSPs o de los dos factores de transcripción que los regulan (HSF), han resultado en la generación de plantas con mayor tolerancia a distintos tipos de estrés (Lee et al., 1995; Prandl et al., 1995; Van Montfort et al., 2001; Soto et al., 1999; Malik et al., 1999; Sun et al., 2001; Papdi et al., 2008).

Proteínas de respuesta al frío

Se han descrito varios genes vegetales que se inducen en respuesta a las bajas temperaturas (Thomashow 1994; Hughes y Dunn 1996; Browse y Xin 2001; Zhu 2001; Chinnusamy et al., 2007; Janmohammadi et al., 2015). Varios de ellos codifican para proteínas denominadas COR (cold regulated), algunos de los cuales pertenecen a la familia de proteínas LEA (como por ejemplo COR47 de *A.thaliana*). Estos genes también se pueden denominar LTI (low temperature induced), KIN (cold-inducible), RD (responsive to desiccation) y ERD (early dehydration-inducible).

Algunas proteínas codificadas por genes COR se encuentran involucradas en la regulación redox (Dal Bosco et al., 2003), respuesta a la deshidratación (Kosová et al., 2013) y en la protección celular a través de impedir la agregación de otras proteínas en condiciones de estrés (Checker et al., 2012). Muchos de los genes COR se encuentran controlados por señales cloroplásticas redox, lo cual sugiere que los cloroplastos son blanco para los procesos de aclimatación al frío (Svensson et al., 2006; Crosatti et al., 2013). Se ha visto que el 67% de los genes de respuesta a las bajas temperaturas son genes dependientes del cloroplasto. Por ejemplo, parecería que existe una relación molecular entre la proteína de localización cloroplástica de cebada *cor14b*, de función desconocida, y el pool plastoquinona/plastoquinol, sugiriendo que su acumulación durante la aclimatación por bajas temperaturas es dependiente del estado redox de los componentes de la cadena de transporte electrónico (Dal Bosco et al., 2003).

Las proteínas codificadas por los genes *COR* se agrupan en base a su similitud de secuencia aminoacídica, siendo muchas de ellas proteínas de la familia de las dehidrinas.

Algunas proteínas COR se localizan en los cloroplastos y tienen propiedades fisico-químicas similares a las dehidrinas como ser sumamente hidrofílicas y mantenerse solubles en solución acuosa luego de su ebullición. Un ejemplo es *COR15a* de *A.thaliana*, una proteína de 15 kDa localizada en el estroma de los cloroplastos (Thomashow 1994).

La función de estas proteínas todavía no está del todo clara. Sin embargo, muchos de ellas se acumulan en las semillas en respuesta a la deshidratación y al ABA (Thomashow 1994). Basado en la relación cercana entre el daño generado por congelamiento y el producido por la deshidratación, se especula que este tipo de proteínas podrían contribuir directamente a la tolerancia a las bajas temperaturas mediante la mitigación de los efectos de la deshidratación asociada al congelamiento.

Mediante análisis bioinformáticos del transcriptoma de trigo, Breton y colaboradores (2003) describieron una familia de genes desconocida hasta el momento, denominada en este trabajo *wcor413* (wheat cold regulated 413). Las proteínas codificadas por los genes *wcor413* tendrían una localización predicha de membrana plasmática o de membrana tilacoidal, y sus predicciones estructurales mostraron similitud estructural con los receptores acoplados a proteínas G. Esto llevó a este grupo de investigación a proponer un rol de señalización para estas proteínas en la respuesta al estrés abiótico. Sin embargo, a la fecha, son muy escasos los trabajos que aportan datos funcionales para la familia *WCOR413*. Uno de ellos reporta la identificación y caracterización del gen *XVSAP1* de la planta de resurrección *Xerophyta viscosa* (Garwe et al., 2003), que codifica una proteína con alta homología a *WCOR413* de trigo. El gen *XVSAP1* se induce en respuesta a la deshidratación, a las altas y bajas temperaturas y a la salinidad. La sobreexpresión del gen en *A.thaliana* aumentó la tolerancia de las plantas transgénicas al estrés osmótico, salino y por altas temperaturas (Garwe et al., 2006), aportando este trabajo la primera evidencia experimental sobre el rol de un miembro de la familia *WCOR413* en la respuesta de tolerancia al estrés abiótico.

Análisis de secuencias homólogas en otras plantas, permitieron la identificación de una proteína *COR413* en *Brachypodium distachyon* (Colton-Gagnon et al., 2014). *BradiCOR413*

se acumula claramente luego de tratamientos con bajas temperaturas, y este gen podría ser usado como indicador de la tolerancia al frío en esta planta (Colton-Gagnon et al., 2014).

En el año 2008, Okawa y colaboradores, interesados en proteínas de la membrana cloroplástica involucradas en la respuesta a temperaturas extremas en plantas, identificaron en *A.thaliana* un gen *COR413* que codifica una proteína de la membrana tilacoidal (COR413-TM), localizada en la membrana interna del cloroplasto, renombrando a este grupo de proteínas como COR413-IM (inner envelope membrane). Mediante el estudio de plantas mutantes en estos genes, examinaron la tolerancia de las mismas al estrés por congelamiento. Tanto a nivel fenotípico como en cuanto a la pérdida de electrolitos, no vieron afectados los mutantes a las temperaturas analizadas.

Si bien los genes WCOR413 están ampliamente distribuidos y conservados en todo el reino vegetal, existe un profundo desconocimiento sobre la función que cumplen en plantas.

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es obtener información acerca de la función y el mecanismo de acción de tres tipos de proteínas que se acumulan en respuesta al ácido abscísico y el estrés abiótico en *P.patens*. Específicamente, este trabajo está enfocado en entender el rol de proteínas de las familias de las DHNs, sHSP y WCOR413, en la tolerancia al estrés abiótico en *P.patens*, así como evaluar a estos genes como candidatos para mejorar la tolerancia al estrés en plantas superiores.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta tesis son los siguientes

1. Caracterizar la función de dehidrinasa de *P.patens* a través de:

- a) La generación, caracterización molecular y fenotípica de mutantes *knockout* de *PpDHNB* en *P.patens*
- b) Profundizar en la caracterización fenotípica del mutante *dhnA*
- c) Analizar *in vitro* las propiedades bioquímicas de PpDHNA
- d) Evaluar el efecto de la expresión heteróloga de PpDHNA y PpDHNB en *A.thaliana*

2. Caracterizar la función de *PpHsp16.4* de *P.patens* a través de:

- a) La generación, caracterización molecular y fenotípica de mutantes *knockout* de *PpHsp16.4* en *P.patens*
- b) Determinar la localización subcelular de PpHsp16.4 en *P.patens* y en sistemas heterólogos

3. Caracterizar la función de *PpCOR413* de *P.patens* a través de:

- a) Determinar la localización subcelular de PpCOR413
- b) La generación, caracterización molecular y fenotípica de mutantes *knockout* de *PpCOR413* en *P.patens*

Materiales y métodos

Material vegetal y condiciones de cultivo

Physcomitrella patens Grandsen tipo salvaje (Schaefer et al., 1991), y los mutantes *dhnA*, *dhnB*, *hsp16.4* y *cor413* fueron utilizadas en todos los estudios. El triple mutante *abi3* fue provisto por el Prof. Ralph Quatrano. Los cultivos vegetales tanto en estado de protonema como de gametofito folioso (en forma de colonias) fueron mantenidos y subcultivados *in vitro* en medio Hoagland's (1,6g/L) + BCDAT (1mM MgSO₄; 1,8mM KH₂PO₄ pH 6,5; 10mM KNO₃; 45μM FeSO₄; 4mM tartrato de amonio) + 1mM CaCl₂ y 10g/L de agar, sobre discos de celofanes estériles según fue descrito por Ashton y Cove (1977). Para la micropropagación se cortaron las colonias con pinzas estériles y los fragmentos de plantas se transfirieron a medio nuevo. La generación de protonema se realizó mediante la maceración en mortero estéril con 2ml de agua doblemente destilada estéril. Las plantas se crecieron a 22°C con un fotoperíodo de 16 horas y un flujo de fotones de 50mmol/m².seg.

Para los experimentos se utilizaron colonias crecidas durante 3 semanas. Los tratamientos con ABA, H₂O₂, methyl viologen, cadmio, ácido salicílico, dithiothreitol, NaCl y manitol se realizaron mediante la incorporación de los mismos en el medio de crecimiento. Las concentraciones de estos compuestos se encuentran indicadas en los pies de figura. Los tratamientos con luz fuerte se realizaron mediante la exposición de las colonias a un flujo de fotones de 350μmol⁻² sec⁻¹. Los tratamientos con UVB se realizaron utilizando una lámpara Hi-Tech (G25T8E, Japan), con UVB 0.034mW.cm⁻². Para los tratamientos de estrés térmico, las colonias de 3 semanas fueron transferidas a 37°C durante 6 días, y los tratamientos con bajas temperaturas a 4°C durante el tiempo indicado en cada figura. Todas las recuperaciones se realizaron en medio normal bajo condiciones normales de crecimiento. El crecimiento de la planta fue monitoreado mediante la medición del diámetro de las colonias crecidas directamente en medio BCDAT suplementado con NaCl o manitol. Todos los experimentos fueron repetidos por lo menos 3 veces, y los diferentes genotipos fueron crecidos juntos en la misma placa.

Las semillas de *A.thaliana* (Col-0) se esterilizaron durante 15 minutos en una solución 7% de hipoclorito de sodio + 0.05% Tween-20. Se lavaron varias veces con agua destilada y se estratificaron en agua a 4°C durante 3 días y luego se traspasaron a placas de petri estériles con medio de cultivo MS a la mitad (2.4g/L Murashige & Skoog, 5g/L de sacarosa, 0.5g/L ácido Monohydrate 2-ethanesufonic [MES], 10% agar, pH 5,7). Las plantas se crecieron a 22°C con un fotoperíodo de 16 horas y un flujo de 120μmol⁻² sec⁻¹. La generación de semillas se realizó mediante el traspaso de las plantas a macetas con tierra y se crecieron durante 40 días a 22°C con un fotoperíodo de 14 horas y un flujo de 200mmol/m².seg. Para los análisis fenotípicos, plantas de 7 días fueron transferidas a medio MS a la mitad suplementado con NaCl (100mM, 150mM, 200mM), placas de agar con una infusión de polyethylene glycol (PEG 6000, 18%) según lo descrito por Verslues et al. 2006, o sorbitol (200mM, 300mM, 400mM). Las plantas fueron crecidas y monitoreadas con imágenes cada 3 días. El tamaño de las rosetas y la elongación de las raíces de 30

plantas fue monitoreada mediante ImageJ (rsb.info.nih.gov/ij/), y se calcularon las desviaciones estándares correspondientes. Las tasas de crecimiento fueron calculadas a partir de datos de 5 tiempos utilizando la función LINEST del software MS Excel. La tasa de crecimiento relativo se obtuvo mediante la normalización de los valores de la tasa de crecimiento a aquellos obtenidos con el genotipo Col-0 salvaje. La recuperación de las plantas fue testada mediante la transferencia de plantas de 7 días a un medio líquido suplementado con NaCl (150 y 200mM) o sorbitol (300 y 400mM), luego de 4 o 8 días se transfirieron a medio normal, y se monitoreó la recuperación luego de 10 días.

Para los análisis de localización transitoria se utilizaron plantas de tabaco *Nicotiana tabacum* cv Petit Havana. Para la preparación de protoplastos, las plantas fueron crecidas en medio Murashige and Skoog suplementado con 2% de sacarosa a 22°C con un fotoperíodo de 16 horas y un flujo de fotones de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$. Para los experimentos de agroinfiltración se utilizaron plantas de tabaco crecidas durante 30 días en tierra.

Cepas y cultivos de microorganismos

- *Escherichia coli*: Se utilizaron las cepas DH5 α y DB3.1. Los cultivos de *Escherichia coli* (*E.coli*) se incubaron en medio Luria-Bertani [(LB) 1% bacto-triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl] líquido o sólido (LB 1% agar). Para la obtención de células competentes se incubaron en medio SOC [2% bacto-triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,05% (10mM) NaCl, 2,5mM KCl, 0,01mM MgCl₂·6H₂O, 2mM glucosa]. Las células de *E.coli* transformadas fueron incubadas en LB con Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LB/Amp), Spectinomicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LB/Sp), Kanamicina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LB/Kn).

- *Agrobacterium tumefaciens*: Se utilizó la cepa GV3101. Esta cepa se creció en medio YEP (1% extracto de levadura, 1% peptona, 0,5% NaCl) líquido o sólido (YEP 1% agar). Para la transformación de estas células se agregó 1 μg de ADN plasmídico y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Se agregó 1mL de medio YEP líquido y se incubó 2 horas a 28°C con agitación. Las células transformadas fueron incubadas a 28°C en medio YEP sólido con los antibióticos correspondientes, Spectinomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (YEP/Sp) o Kanamicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (YEP/Kn). También se agregaron los antibióticos Rifampicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Gentamicina 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- Hongos fitopatógenos: *Pythium irregulare* fue crecido durante 5 días en placas con PDA (potato dextrose agar) comercial a 23°C. Los tratamientos de las colonias de *P.patens* se realizaron de manera de levantar una porción del medio PDA agar con el hongo crecido y depositado encima de la colonia de manera que quede en contacto.

Diseño de construcciones para la disrupción génica en *P.patens*

Para la generación de las construcciones para la disrupción génica se utilizaron los vectores pMT123 y pUBW302, los cuales contienen los genes de resistencia para los antibióticos hygromicina y G418, respectivamente. Para el gen *PpDHNB*, se realizó una construcción que contiene un fragmento genómico de 521 pb en el extremo 5' corriente arriba del promotor NOS y un fragmento genómico de 545 pb en el extremo 3' insertado corriente debajo de la señal del terminador *ocs*. La secuencia 5' del ADN genómico

(correspondiente a la secuencia de los pares de bases 68 al 589) fue amplificada por PCR utilizando primers específicos que contienen sitios de restricción para las enzimas KpnI, en el caso del primer forward (5´ caccgggtaccggctttgccacgcatc 3´), y XhoI para el primer reverse (5´ gccaccgcttagactcgagtccg 3´). El fragmento del extremo 3´ (correspondiente a la secuencia 847 a 1392) fue amplificado mediante PCR utilizando primers con sitios para las enzimas XbaI para el primer forward (5´ gaggttctagactgccaacgctagcacag 3´) y NotI para el primer reverse (5´ tgctccagcctccgcgccgctgat 3´).

La construcción para la disrupción del gen *PpHsp16.4* se realizó en el vector pUBW302. Para ello se clonó un fragmento de 792 pb de la región 5´ de la secuencia genómica de *PpHsp16.4* (bases -711 a 79 desde el codón de inicio) en la región corriente arriba del promotor 35S del vector, y un fragmento de 876 pb correspondiente a las bases 292 a 1168 de la secuencia genómica del gen insertada corriente abajo de la señal del terminador ocs del vector. La secuencia genómica 5´ fue amplificada por PCR utilizando los primers específicos que contienen sitios de restricción para las enzimas KpnI (forward 5´ ccgggtaccatccattgatctaac 3´) y HindII (reverse 5´ cacaagcttctgggactgtggat 3´). La secuencia 3´ del gen fue amplificada a partir del ADN genómico utilizando los primers forward 5´ tgtggatccggactaccaattgtgact 3´ y reverse 5´ acagcgccgcactagcacctcccaa 3´, y clonados en el vector utilizando las enzimas BamHI y NotI.

Para la generación de la construcción de reemplazo de *PpCOR413* se utilizó el vector pUBW302, clonándose un fragmento de 803 pb en el extremo 5´, y un fragmento de 771 pb en el extremo 3´ del plásmido flanqueando el cassette de resistencia a kanamicina (nptII). El fragmento 5´ (correspondiente a la secuencia -314 a 488) fue amplificado mediante el uso de primers específicos forward (5´ ggggtaccgtgcatgggtcagg 3´) con el sitio para la enzima de restricción KpnI, y reverse (5´ aaagcttaccacagaccatactcgc 3´) con el sitio para HindIII. El fragmento 3´ (correspondiente a la secuencia 745 a 1511) se amplificó con el primer forward (5´ ctggatccgcttctgggtatgggt 3´) y reverse (5´ tgtctagagcaggagaggatggat 3´), con los sitios para las enzimas de restricción BamHI y XbaI, respectivamente.

Diseño de construcción para la sobreexpresión de PpDHNA en P.patens

Para la generación de la construcción para la sobreexpresión génica de PpDHNA se utilizó el vector pTubi de Gateway, el cual contiene el gen de resistencia para el antibiótico G418 en la planta, el promotor constitutivo de la ubiquitina. Para ellos se realizó previamente una construcción en el vector pENTR2B con la secuencia génica entera de *PpDHNA*, amplificada mediante PCR utilizando los primers: forward 5´ cgggatccatgaatcagtacggaaga 3´ y reverse 5´ ttgatctctagtggtgcagcttctc 3´, utilizando las enzimas BamHI y EcorV para el clonado en el vector. La secuencia del gen *PpDHNA* en el vector final quedará flanqueada por las secuencias genómicas del locus 108 de *P.patens*, donde será integrado en el genoma.

Diseño de construcción para la fusión in vivo PpHsp16.4-Citrina

Para la construcción de fusión *knock-in* se utilizó el vector pCTRN-NPTII 2, generado por

Makino et al., 2012 y obtenido de la colección de clones de Physcobase (<http://moss.nibb.ac.jp>). Un fragmento de ADN genómico correspondiente a las bases -25 a 967 (a partir del codón de inicio) de *PpHsp16.4*, el cual incluye toda la secuencia codificante del gen pero sin el codón de finalización, fue amplificado por PCR utilizando los primers específicos 5' gtggtaccttggtcaactgagagaa 3' (forward) y 5' atcgatatctcccccatagtcacctc 3' (reverse), conteniendo los sitios de restricción para las enzimas KpnI y EcoRV respectivamente. Este fragmento (fragmento 5') fue clonado corriente arriba y en marco con el gen codificante para la proteína fluorescente Citrina en el vector. Luego, un fragmento de 1131 pb, la cual incluye la secuencia genómica 3' UTR del gen (bases 995 a 2099) fue amplificada por PCR utilizando los primers específicos 5' acaggatccgggctctctagaaatgac 3' (forward) y 5' ttcgcgccgcaagcttttggttatg 3' (reverse), los cuales contienen los sitios de restricción para las enzimas BamHI y NotI respectivamente. Este fragmento fue clonado corriente abajo del cassette de selección nptII en el vector.

Generación y caracterización molecular de mutantes knockout en *P.patens*

La generación de protoplastos de *P.patens* y la subsecuente transformación fue realizada según Schaefer et al. 1991. Brevemente, los protoplastos aislados (concentración final de 1.6×10^6 protoplastos/mL) fueron incubados con 30 μ g de plásmido de ADN linealizado (digerido con KpnI). Luego del tratamiento con polyethylenglicol (PEG) y shock térmico a 45°C, los protoplastos fueron incubados durante 7 días a 22°C en medio BCDAT suplementado con 10mM de CaCl₂ y 0.44M de manitol. Luego se transfirieron a medio BCDAT suplementado con 25 μ g/mL de hygromicina en el caso del mutante *dhnB* o 40 μ g/mL de G418 en el caso de los mutantes *cor413* y *Hsp16.4*, y se dejaron crecer durante 10 días. Las colonias emergentes resistentes fueron transferidas nuevamente durante 7 a 10 días a placas con medio normal sin selección, para luego ser transferidas una vez más a medio con selección. Las colonias resistentes fueron finalmente analizadas en cuanto a la correcta incorporación de la construcción de reemplazo en el locus deseado.

La incorporación de la construcción de reemplazo en el locus de *PpDHNB* fue confirmada mediante la amplificación por PCR de la secuencia genómica utilizando los siguientes primers: (a) forward 5'Ups (5' ccagtcgggggctgtctcg 3'); (b) reverse 3'Dwns (5' tcgtgtaggagaggcgtcag 3'); (c) reverse NOS (5' cgatcggcgggggtcata 3') y (d) forward ocs (5' ggccgtccgctctaccgaaagt 3'). Para verificar la expresión nula del gen debido a la disrupción del mismo, se aisló ARN total de plantas salvajes y mutantes controles y tratadas con ABA 50 μ M durante 24 horas, y se realizaron análisis por Northern blot según Saavedra et al., 2006. Como sonda se utilizó el cDNA completo de *PpDHNB* marcado con α^{32} P-dCTP.

La confirmación de la incorporación de la construcción en el locus *PpHsp16.4* se realizó mediante PCR utilizando los siguientes primers: (a) 5' ataaaaacaataatacaaaaacct 3' o (e) 5' catccattctactgttgaaccacct 3', primers forward para *PpHsp16.4a* o *PpHsp16.4b* respectivamente, en combinación con los primers reverse (c) 5' ctttctgtgttcttgatgcagttag

3'. Para identificar posibles concatemos cabeza-cola se utilizó el primer (c) junto con el primer (d) 5'ctaccggtgatattgctgaagagc 3'. La secuencia genómica completa fue amplificada utilizando el primer (a) con el primer (b) 5'tatagatattccttatattcaactcaa 3' para *PpHsp16.4a*, y el primer (e) junto con el primer (f) 5'catcttctgcattattcttggggg 3' para *PpHsp16.4b*. Para verificar la expresión nula de los genes *PpHsp16.4a* y *PpHsp16.4b* en los mutantes, se extrajo ARN total de plantas salvajes y de los genotipos mutantes tratadas con aba 50µm durante 24 horas. se realizaron ensayos por northern blot de la misma manera que los realizados para dhnb, pero utilizando la secuencia completa del cdna de *PpHsp16.4* como sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP.

para la confirmación de la incorporación de la construcción de reemplazo en el locus *PpCOR413* se realizó mediante pcr utilizando los siguientes primers: (a) forward 5'cgatcgcatggaacaattctctct 3' junto con el primer (b) reverse 5'ctaactgcatcaagaacacagagaaag 3', y los primers (c) forward 5'ctaccggtgatattgctgaagagc 3' junto con el primer (d) reverse 5'gttagttttcacagattccaggtg 3'. También se realizó un PCR con la combinación de los primers (a) + (d), para confirmar la presencia del inserto en el locus correcto. Para verificar la expresión nula del gen *PpCOR413*, se aisló ARN total de plantas salvajes y mutantes controles y tratadas con ABA 50µM durante 24 horas, y se realizaron análisis por Northern blot. Como sonda se utilizó el cDNA completo de *PpCOR413* marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. Por último se realizó un análisis de la ploidía de las plantas mutantes y salvajes.

Caracterización fenotípica de mutantes knockout de *P.patens*

Para los tratamientos de estrés osmótico, los genotipos salvajes y mutantes fueron crecidos durante 3 semanas en medio normal con celofán y luego se transfirieron las colonias a medio suplementado con 900mM de manitol durante 10 días. La supervivencia de las plantas fue testada mediante la transferencia a medio normal y monitoreada la recuperación de las mismas durante 17 días. Para los tratamientos con estrés salino y con DTT (Dithiothreitol), se utilizó el mismo procedimiento utilizando medio suplementado con 500mM de NaCl o 10mM de DTT como agentes de estrés. El estrés por altas temperaturas se realizó de manera similar, pero mediante la incubación durante 7 días a 37°C, con humedad y fotoperíodo controlados. Los análisis de bajas temperaturas se realizaron con colonias previamente crecidas durante 20 días a 23°C. Se aislaron gametofitos de cada uno de los genotipos y se aclimataron durante 4 días a 0°C. Luego se incubaron durante 75 minutos a -10°C en placas de Petri con 10mL de agua estéril, y se recuperaron en medio normal durante 4 días a 23°C. Para el análisis fenotípico de las plantas en altas intensidades de luz, se crecieron las plantas salvajes y mutantes con un flujo de fotones de $350\mu\text{mol}^{-2}\text{sec}^{-1}$ durante 17 días con fotoperíodo y temperatura controlados.

Caracterización molecular de líneas de *P.patens* knock-in

La incorporación de la construcción génica *PpHsp16.4-Citrina* en el locus de *PpHsp16.4* fue confirmada por PCR utilizando los siguientes primers específicos: (g) 5'ccggtacctcattgatctaac 3' y (h) 5'cgccctcgccggacacgctgaact 3', amplificando de esta

manera un fragmento que contiene una región genómica corriente arriba a la fusión PpHsp16.4-Citrina incorporada en el genoma y parte del gen Citrina. Para verificar la correcta inserción de esta fusión, se realizaron ensayos de Western blot a partir de muestras de proteínas totales extraídas de plantas salvajes y transgénicas controles, y tratadas con ABA 50 μ M, 300mM de NaCl, 500mM de manitol e incubadas a 37°C, durante 24 horas. Además de esto, también se incubaron plantas a 37°C durante 48 horas, para luego ser transferidas a condiciones normales de crecimiento durante 6 horas, con el fin de determinar los niveles de expresión de la proteína de fusión durante la recuperación de las plantas. Los ensayos por Western blot se realizaron de acuerdo a Saavedra et al 2006.

Caracterización molecular de líneas de *P.patens* que sobreexpresan PpDHNA

La incorporación de la construcción génica para la sobreexpresión de PpDHNA en el locus 108 regulada bajo el promotor constitutivo de la ubiquitina fue confirmada mediante ensayos de Western blot a partir de muestras de proteínas totales extraídas de plantas salvajes y transgénicas controles, utilizando el anticuerpo específico anti-PpDHNA. Además también se realizaron estudios por Northern blot de estas mismas plantas, confirmando así la correcta sobreexpresión del gen PpDHNA y de la proteína codificada.

Generación de construcciones de fusión con YFP y GFP

Las secuencias completas de cDNA de *PpDHNA*, *PpDHNB*, *PpHsp16.4* y *PpCOR413* (estas dos últimas sin los codones stop) fueron amplificadas a partir de ARN de plantas de *P.patens* tratadas con ABA 50 μ M durante 24 horas, y utilizando los siguientes primers: forward 5' gctcaagctttgaatcagtagcgaagagaacagc 3' y reverse 5' gctcggatccctagtggtgcagcttctccttg 3' para *PpDHNA*, forward 5' gctcaagctttggccgcccagtagcac 3' y reverse 5' gctcggatccctacacatcagtggtg 3' para *PpDHNB*, forward 5' gtggatccttggtcaacttgagag 3' y reverse 5' atatctcgagtgcttcccccatagtagcac 3' para *PpHsp16.4*, y 5' tgatggtaccgatggcctctcacatcgt 3' y 5' atatctcgagtgcaacaccataccaggaa 3' para *PpCOR413*. Los fragmentos de PCR resultantes fueron clonados utilizando las enzimas de restricción HindIII y BamHI en el vector pCAMBIA1201 que contiene la proteína YFP, derivada del vector pEYFP-C1 (CLONTECH), tanto para la secuencia codificante para *PpDHNA* como para *PpDHNB*. Este vector contiene el promotor constitutivo 35S, el terminador 3' nos y el gen de resistencia al antibiótico hygromicina (*hyg*) como marcador de selección. En estas construcciones, el marcador YFP queda fusionado en marco al extremo 5' de la secuencia de cDNA de *PpDHNA* y *PpDHNB*, produciendo así las proteínas quiméricas YFP:PpDHNA y YFP:PpDHNB en las plantas transgénicas resultantes. Para la secuencia codificante para *PpHsp16.4* y *PpCOR413* se utilizó el sistema de clonado de Gateway. Para ello, los fragmentos de PCR resultantes fueron clonados utilizando las enzimas de restricción BamHI y XhoI para *PpHsp16.4* y KpnI y XhoI para *PpCOR413* en el vector de entrada pENTR2B (Gateway, Invitrogen). Estas construcciones fueron posteriormente recombinadas utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen) en el vector binario de destino pK₇FWG₂, el cual contiene la secuencia codificante para GFP regulada bajo el control del promotor constitutivo 35S. De esta

manera, las secuencias de cDNA de *PpHsp16.4* y *PpCOR413* se fusionaron en marco en el extremo 5' de GFP, resultando en genes quiméricos 35S:PpHsp16.4:GFP y 35S:PpCOR413:GFP.

Los plásmidos resultantes fueron introducidos en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* pGV3101/pMP90 mediante electroporación.

Transformación de A.thaliana y caracterización molecular de las líneas transgénicas

Para la transformación de *A.thaliana* con las construcciones YFP:PpDHNA, YFP:PpDHNB y 35S:PpHsp16.4:GFP se utilizaron 12 macetas de plantas con flores para cada transformación. La infiltración de flores mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se realizó según Clough y Bent 1998. Las semillas T1 de las plantas infiltradas fueron recolectadas y seleccionadas mediante su germinación en medio MS al medio suplementado con hygromicina 30µg/mL para el caso de las DHN y con 50µg/mL de kanamicina para *PpHsp16.4*. 50 plantas resistentes de cada línea fueron transferidas a tierra para la producción de semillas. Las líneas homocigotas fueron luego producidas a partir de las plantas T2 resistentes y utilizadas para los siguientes análisis moleculares y fenotípicos. La expresión de los transgenes y la presencia de las fusiones proteicas fueron testeadas a partir de 10 líneas independientes mediante estudios de Northern blot y Western blot. Tres líneas independientes fueron seleccionadas para los estudios posteriores fenotípicos.

Análisis de ARN

Se extrajo ARN total de plantas de *P.patens* o de *A.thaliana* salvajes y transgénicas controles o tratadas, utilizando un protocolo basado en extracción fenol/cloroformo, seguido por precipitación con LiCl 10µg de ARN total fue separado en gel de agarosa desnaturalizante con formaldehído y transferido a membrana de nylon (Hybond XL, Amersham Pharmacia Biotech), de acuerdo con Sambrook et al 1989. Las membranas fueron prehibridadas a 65°C en 5X SSPE, 5X Denhardt's, 0.2% SDS y 0.5mg.mL⁻¹ de esperma de salmón desnaturalizado. Se dejó hibridando toda la noche a 65°C. Los fragmentos de ADN correspondientes a los cDNAs completos de *PpDHNA*, *PpDHNB*, *PpCOR413* y *PpHsp16.4* fueron marcados con [α^{32} P]-dCTP utilizando el sistema de marcado Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech) y utilizados como sondas. Las membranas fueron lavadas dos veces durante 30 minutos a 65°C con 1X SSC-0.5% SDS y expuestas en films de autorradiografía. Se utilizó la tinción con bromuro de etidio del ARN como control de carga.

Northern blot

Las muestras de ARN total fueron resuspendidas en solución con formaldehído 2.2M, formamida al 50% (v/v), 1x buffer MOPS pH 7 [0,2M MOPS (ácido 3-N-morfolinopropansulfónico), 0,05M NaAc, 0,01M EDTA] y Bromuro de Etidio aproximadamente 70ng/ml. Posteriormente fueron desnaturalizadas mediante incubación a 65°C por 10 minutos y separadas en geles de agarosa desnaturalizante con formaldehído 2.2M utilizando buffer MOPS 1x para la corrida electroforética. 10µg de ARN

total se separaron en un gel de agarosa desnaturalizante. Se transfirió el ARN a membranas de nylon (Hybond-N+, GE Healthcare, Amersham) en solución SSC 20X (3M NaCl; 0,3M citrato de sodio) durante toda la noche. El ARN transferido fue fijado a membranas mediante luz UV en un crosslinker.

Las sondas utilizadas fueron digeridas con enzimas de restricción a partir de la región de cDNA de cada gen clonados en plásmidos. Estas sondas fueron marcadas utilizando el kit MegaPrime DNA Labelling System (GE Healthcare, Amersham). Se mezclaron 50 ng de sonda y 5 μ L de solución de primers al azar en un volumen de 50 μ L. Se desnaturalizó durante 5 minutos a 100°C y se agregó 10 μ L de buffer (con dNTP's incluidos) + 5 μ L de α^{32} P-dCTP + 2 μ L de enzima Klenow (UNIDADES). Se incubó durante 20 minutos a 37°C y luego se purificó mediante columnas G-25 de GE Healthcare, Amersham.

La hibridación de la sonda en la membrana se realizó a 65°C durante toda la noche en solución de prehibridación (5X SSPE [43,83g NaCl, 6,9g NaH₂PO₄, 1,85g EDTA, 6,75mL NaOH 10M; pH 7,4], 0,2% SDS, 5X Denharts [1mg/mL Ficoll, 1mg/mL BSA, 1mg/mL PVP], 500 μ g/mL ssDNA) . Se lavó dos veces con SSC 5X, y dos veces con SSC 1X. Estas soluciones se realizaron a partir de SSC 20X (175,2g NaCl + 88,2g citrato-Na₃, pH 7).

Se expusieron las membranas radioactivas en un cassette durante un día y se revelaron en un fotoimager.

Análisis por Western Blot

Se extrajeron proteínas solubles de acuerdo a protocolos estándares (Sambrook et al., 1989), el cual consistió en moler el material vegetal en un mortero previamente enfriado, trabajando a 4°C con buffer con de extracción (50mM Tris pH 7.2, 250mM sacarosa, 5mM EDTA, 10mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 10mM β -mercaptoetanol y 1mM PMSF). Luego se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C. Se aisló el sobrenadante y se realizó una centrifugación adicional con las mismas características que la anterior.

Para determinar la concentración proteica de los extractos obtenidos se utilizó el reactivo de Bio-Rad (dye reagent concentrate Coomassie brilliant blue G-250). Siguiendo las instrucciones de la casa comercial se siguió el protocolo descrito por Bradford (Bradford, 1976), basado en la afinidad de las proteínas por el azul de Coomassie. Se preparó una solución concentrada de albúmina bovina (BSA), como proteína estándar, y a partir de esta solución madre se prepararon varias diluciones con concentraciones finales de 1, 2, 4, 8, 16 y 25 μ g/ μ L. Se pipetearon 0,8mL de estas diluciones en tubos limpios y se añadieron 0,2mL de reactivo Bradford. Para valorar las muestras se añadieron entre 5 y 10 μ l de éstas más 0,2mL de reactivo Bradford, y se completó con agua destilada. Se determinó la absorbancia a 595nm, tanto de la curva patrón de calibración como de las muestras. La concentración de proteína de las muestras se calculó extrapolando a partir de los valores de absorbancia de la recta patrón, teniendo en cuenta el volumen de muestra añadido.

10 μ g de proteínas solubles fueron separadas en un gel 10% poliacrilamida y bloteadas en membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham, GE Healthcare) durante toda la noche. Las membranas fueron bloqueadas en buffer TBS (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl pH 7.4) con 5% w/v de leche descremada en polvo y 0.2% de Tween-20 por una hora a

temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron el anticuerpo comercial anti-GFP producido en conejo (Sigma Aldrich, stock 1mg/ml) diluído 1/4000 en TBS + 0.1% Tween, y el anticuerpo policlonal anti-PpDHNA, diluído 1/1500. Se utilizó el anticuerpo secundario IRDye 800CW (cabra anti-conejo, LI-COR), diluído 1/5000. Las proteínas fueron visualizadas en un G-Box. Las membranas fueron luego incubadas con 0.5% Ponceau Red durante 10 minutos y lavadas con agua destilada, visualizándose de esta manera la subunidad mayor de la proteína Rubisco, utilizada como control de carga de las muestras.

Pérdida de iones

La fuga de iones fue medida en plantas de *P.patens* salvajes, y en los mutantes *dhnA* y *dhnB*, tal como se describe en Koster et al. 2010. Los tratamientos de estrés se realizaron mediante la transferencia de los diferentes genotipos, crecidos en las mismas placas con medio normal con celofán (6 colonias por genotipo), a placas con medio suplementado con 200mM y 500mM de NaCl, o 400mM y 900mM de Manitol durante 3 días. 4mL de agua deionizada fueron agregados a 3 colonias por muestra e incubados en un shaker orbital durante 15 minutos a baja velocidad (40rpm). Luego las muestras fueron hervidas durante 30 minutos y aclimatadas a temperatura ambiente. Se midió la conductividad antes y después de la ruptura de la membrana utilizando un conductímetro (Orion Research, modelo 105, Inc., USA). La fuga de iones fue expresada como un porcentaje de los electrolitos totales que se fugaron de la solución durante la exposición a las altas temperaturas. Se realizó el experimento por triplicado.

Tinción con colorante azul de Evans

La cuantificación de la muerte celular fue realizada mediante la tinción con el colorante vital Evans Blue, lo cual se realizó como se describe en Ponce de León et al., 2007. Brevemente, 2 colonias del musgo (aproximadamente 50mg de material vegetal fresco) se incubaron durante 30 minutos con 0.1% w/v de Evans Blue (Sigma Aldrich). Luego se lavó 4 veces con agua destilada MilliQ, con el fin de remover los excesos de colorante que no ingresó a la célula. Para desteñir, las plantas fueron incubadas con 6mL de solución de desteñido (50% metanol, 1% SDS) durante 30 minutos a 60°C. El colorante desprendido fue cuantificado espectrofotométricamente mediante la medición de la absorbancia a 600nm. Los experimentos fueron repetidos 3 veces, utilizando 24 colonias por genotipo para cada condición.

Inmunohistoquímica

Gametofitos de colonias de *P.patens* de 3 semanas de crecimiento, controles y tratadas con 50 μ M de ABA durante 24 horas, fueron fijadas durante toda la noche en 2% de glutaraldehído en buffer fosfato de sodio 0.05M, pH 7.2. Las muestras fijadas se lavaron 3 veces en buffer y luego se deshidrataron en etanol a concentraciones seriadas. Se embebieron lentamente en resina LR-White (Electron Microscopy Sciences, Washington, Pennsylvania, USA) y se curaron a 60°C durante 7 días. Cortes de 750nm de espesor

fueron cortados utilizando un ultramicrotomo Sorvall MT6000, y luego se secaron en portaobjetos recubiertos con Vectabond.

Los preparados se bloquearon en PBS/BSA (1xPBS, 3% BSA) mediante incubación por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron una vez con PBS por 5 minutos y luego se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-PpDHNA diluído 1/100 en PBS/BSA. Los preparados se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos y luego fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario IgG anti-conejo, marcado con Alexa Fluor 594, diluído 1/20 en PBS/BSA. Se lavaron con 3 cambios de PBS durante 5 minutos y las muestras fueron montadas con una pequeña gota de glicerol y examinadas en un microscopio de fluorescencia Olympus IX81. Para Alexa Fluor 594 y la tinción con Calcofluor White se utilizaron los filtros 590-617nm y 440-510nm, respectivamente.

Protoplastos de P.patens para inmunohistoquímica

La generación de protoplastos de plantas salvajes y que sobreexpresan PpDHNA de *P.patens* fue realizada mediante la digestión de la pared celular con driselasa 0.2% (resuspendida en 8% manitol) durante toda la noche. Los protoplastos resultantes fueron filtrados con filtros de 40 μ m y centrifugados durante 10 minutos a 80g. Luego se lavaron con 10 mL de buffer de lavado (8% manitol) y la actina F fue fijada con 300 μ M de MBS (3-maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimide ester) y 5mM de sulfo-EGS. Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces y se resuspendieron en 1 mL de buffer de lavado. Una gota de protoplastos fue depositada en un portaobjetos previamente tratado con Vectabond, y se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 3% de paraformaldehído en buffer PEM (50mM PIPES pH 6.9, 5mM EGTA, 1mM MgSO₄), suplementado con 1% DMSO, 0.3mM PMSF, 0.05% Tritón X-100.

Los protoplastos fijados se lavaron con PBS pH7.4 y se bloquearon con PBS + 3% BSA durante 30 minutos. Se lavaron 2 veces con PBS y luego se procedió con la inmuno. Para ello se incubaron con el anticuerpo específico anti-PpDHNA (1/100) en PBS + 3% BSA durante toda la noche a 4°C. se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario anti ratón Alexa 488 (1/750) en PBS + 3% BSA, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS durante 5 minutos y se visualizaron en un microscopio confocal.

Localización de proteínas en líneas transgénicas de A.thaliana.

Para los análisis de localización subcelular de YFP:PpDHNA, YFP:PpDHNB y PpHsp16.4:GFP se utilizaron plantas transgénicas de 7 días luego de germinadas. Se realizaron observaciones microscópicas de fluorescencia in vivo utilizando un microscopio confocal Leica TCS-SP5 (505nm de excitación y 530nm para la emisión para YFP, y 488nm para GFP), utilizando el servicio de la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo. 3 líneas independientes T2 de cada construcción fueron utilizadas.

Localización subcelular de PpHsp16.4-GFP y PpCOR413-GFP en tabaco

Para los análisis de expresión transitoria, protoplastos de tabaco fueron obtenidos a partir de plantas crecidas *in vitro* durante 20 días y electroporados con las construcciones 35S:PpHsp16.4-GFP, 35S:PpCOR413-GFP o con 35S:GFP, siguiendo el protocolo descrito en Foresti et al., 2006. Los protoplastos fueron analizados en un microscopio confocal, luego de 24 horas de realizada la transfección con las construcciones. Para los experimentos de agroinfiltración, plantas de tabaco fueron crecidas en tierra durante aproximadamente 30 días y sus hojas fueron infiltradas con cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo la construcción de interés según Neuhaus y Boevink, 2001. Dos días luego de la infiltración, se cortaron porciones de las hojas agroinfiltradas y se montaron en portaobjetos con agua para ser analizadas en un microscopio confocal.

Determinación de la concentración de clorofila

Para las medidas de clorofila se tomaron muestras control y durante el estrés. Se determinó el contenido en clorofila, macerando cada colonia en un mortero con 5ml de 80% (v/v) de acetona y filtrando el material con papel Whattman. La clorofila total se calculó como Clorofila a + Clorofila b (mg/g de peso fresco) usando la siguiente fórmula: Cla mg/g = [(12,7 x Abs₆₆₃) - (2,6 x Abs₆₄₅)] x ml de acetona / mg de tejido fresco; Clb mg/g = [(22,9 x Abs₆₄₅) - (4,68 x Abs₆₆₃)] x ml de acetona / mg de tejido fresco.

Análisis filogenéticos

Para el análisis filogenético de secuencias de proteínas traducidas a partir de genes de sHSP de *A.thaliana* y de arroz, las secuencias fueron obtenidas a partir de la base de datos de Phytozome, basándose en un análisis anteriormente reportado en la literatura. Para la identificación de genes codificantes para sHSPs en el genoma de *P.patens*, se examinó la presencia del dominio conservado α -cristalino de todos los genes anotados en la base de datos Phytozome. Las secuencias fueron alineadas con ClustalW (MEGA versión 5) para el análisis filogenético subsiguiente. Se realizó la construcción de árboles filogenéticos utilizando el método Neighbor joining. Debido a las grandes diferencias en los tamaños de algunos miembros de la familia de proteínas sHSP de *P.patens*, sólo 17 de los 22 genes de esta especie se muestran en los resultados.

Los número de accesos de sHSP de arroz fueron: Os16.9I [Os01g0136100], Os16.9II [Os01g0136000], Os16.92I [Os01g0136200], Os16.93I [Os01g0135900], Os17.4AI [Os03g0266900], Os17.4BI [Os03g0267200], Os17.4CI [Os03g0267000], Os17.4DI [Os03g0266300], Os17.6CII [Os02g0217900], Os17.8II [Os01g0184100], Os17.6BIII [Os02g0782500], Os18.8IV [Os07g0517100], Os22.2V [Os05g0500500], Os17.6PX [Os06g0253100], Os22.3ER [Os04g0445100], Os26CP [Os03g0245800], Os22MT [Os02g0758000], Os22.4MT [Os06g0219500], Os16.9C [Os02g0711300], Os17.6A [Os01g0135800], Os18 [Os11g0244200], Os18.2 [Os02g128000], Os21.2 [Os02g0107100]. Los números de acceso de los genes de *A.thaliana* fueron: AtHsp17.4I [At3g46230], AtHsp18.1I [At5g59720], AtHsp17.6BI [At2g29500], AtHsp17.6AI [At1g59860], AtHsp17.8I [At1g07400], AtHsp17.6CI [At1g53540], AtHsp18.5VI

[At2g19310], AtHsp22.0ER [At4g10250], AtHsp15.4IV [At4g21870], AtHsp15.7PX [At5g37670], AtHsp21.7 V [At5g54660], AtHsp17.4III [At1g54050], AtHsp17.6II [At5g12020], AtHsp17.7II [At5g12030], AtHsp14.2 [At5g47600], AtHsp26.5 [At1g52 560], AtHsp21CP [At4g27670], AtHsp23.5MT [At5g51440], AtHsp23.6MT [At4g25200]. Los números de acceso de las proteínas deducidas de *P.patens* se encuentran ilustradas en la tabla 1.

Para el análisis filogenético de proteínas traducidas a partir de genes pertenecientes a la familia COR413, se obtuvieron secuencias de *P.patens*, *A.thaliana*, trigo y *B.distachyon*. Las secuencias fueron obtenidas a partir de la base de datos de Phytozome. Las secuencias fueron alineadas con ClustalW (MEGA versión 6) para el análisis filogenético subsiguiente y se realizó la construcción de árboles filogenéticos utilizando el método Neighbor joining. Los número de accesos de las proteínas de *A.thaliana* fueron: At1g29390.2, At1g29390.1, At1g29395.1, At4g37220.1, At3g50830.1 y At2g23680.1. Los número de accesos de las proteínas de *P.patens* fueron: Phypa_28204, Phypa_181142, Phypa_105296, Phypa_122476, Phypa_137869, Phypa_122476 y Phypa_137869. El número de acceso de la proteína de trigo fue AAO24627.1 y las de *B.distachyon* fueron: Bradi2g16300.2, Bradi2g45855.1 y Bradi1g07441.1.

Análisis por Southern blot

Para la extracción de ADN genómico se utilizó material vegetal fresco tal como se describe en Dellaporta et al., 1983, y mediante el agregado adicional de un tratamiento con ARNasa y una extracción con fenol. El ADN genómico fue analizado mediante la digestión de 10µg del mismo con las enzimas de restricción BamHI y PstI. El ADN digerido fue separado en un gel de agarosa 1% y transferido a una membrana de nylon (Hybond XL, Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo a Sambrook et al. 1989. Las membranas se prehibridaron e hibridaron de la misma manera a lo descrito en la sección Northern blot. Un fragmento de ADN digerido con NcoI, correspondiente a un segmento del promotor 35S y al gen codificante para la selección nptII, fue marcado con [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP utilizando el sistema de marcado Rediprime II random priming (Amersham Pharmacia Biotech), y utilizado como sonda para este estudio.

Análisis por Microscopía electrónica de transmisión

Para los análisis mediante Microscopía Electrónica de Transmisión se crecieron plantas salvajes y mutantes *cor413* en medio normal durante 20 días (Controles) y se pasaron a altas intensidades de luz durante 48 horas (350µE). Se cortaron gametofitos de estas plantas y se fijaron en 3,5% de Glutaraldehído en Buffer Fosfato pH 7,2-7,4 durante toda la noche. Se lavaron 5 veces en Buffer Fosfato durante 10 minutos y se incubaron a 4°C durante toda la noche en OsO₄ 1% en Buffer Fosfato. Se lavaron nuevamente 5 veces durante 10 minutos en Buffer Fosfato y las muestras se deshidrataron durante 15-20 minutos sucesivamente en etanol 25%, 50%, 75%, 95% (dos cambios), 100% (2 cambios) y 2 cambios de acetona. La impregnación de las muestras se realizó en acetona:araldita, en primer lugar durante 30 minutos con una relación 2:1, luego durante

60 minutos con una relación 1:1, durante 60 minutos con una relación 1:2, y por último en araldita pura toda la noche a 4°C. Se aclimataron las muestras a temperatura ambiente y se realizaron los bloques con araldita pura nueva. Se polimerizaron a 58°C - 60°C durante 48 horas para luego poder realizar los cortes semifinos de 300nm de espesor, utilizando un ultramicrotomo RMC, MT-X, equipado con cuchilla de vidrio. Los cortes fueron teñidos con azul de metileno al 1% y se seleccionaron los campos de los cuales se obtuvieron los cortes ultrafinos (50nm). Estos cortes ultrafinos fueron montados en grillas de cobre de retículo 200 mesh y posteriormente contrastados con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo al 1%. Las grillas fueron visualizadas en un Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol, JEM 1010, operado a 100kV. Las imágenes de interés fueron captadas con una cámara digital HAMAMATSU C4742-95, acoplada al MET.

Medidas de fv/fm

Se crecieron colonias de *P.patens* salvajes y mutantes *cor413* en la misma placa de Petri, 6 por genotipo, en condiciones normales a 23°C durante 20 días. Se realizaron tratamientos durante 5 y 7 días con altas intensidades de luz (350μE), las cuales se realizaron acercando las placas a los tubos de luz led, y tratamientos en frío (4°C). Los controles corresponden a plantas crecidas durante 27 días con luz normal (70μE) y temperatura de 23°C.

Las medidas de fv/fm fueron realizadas en un fluorómetro PAM Hansatech FSMII, utilizando una luz actínica de base de 1000 μmol.m⁻².s⁻¹ y pulsos de luz saturante de 2500, 5000, 7600, 10000 y 13000 μmol.m⁻².s⁻¹. Para ello, las colonias fueron posicionadas en una pinza, de manera que la luz insida del lado abaxial de la colonia, y no donde se encuentran los gametofitos. Antes de las medidas las colonias fueron aclimatadas en la misma pinza en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente, o en frío en el caso de las medidas con las plantas tratadas con bajas temperaturas. El parámetro Fv/Fm fue calculado como $(F_m - F_0)/F_m$.

Estrategia

La estrategia general de este trabajo se basó en el análisis funcional de genes de respuesta al estrés abiótico en *P.patens*, mediante la generación de mutantes *knockout* en esta planta y la sobreexpresión de algunos de estos genes en *A.thaliana*.

En el caso de los genes que codifican proteínas de la familia de las DHNs, se estudiaron dos miembros de los seis que existen en el genoma de *P.patens*. Estos genes, *PpDHNA* y *PpDHNB*, fueron aislados y caracterizados por nuestro grupo (Saavedra et al., 2006; Ruibal et al., 2012). En este trabajo se profundizó en la caracterización funcional de ambos genes en *P. patens*, así como en un sistema heterólogo, *A. thaliana*, dando lugar a resultados novedosos que fueron publicados en (Ruibal et al., 2012). En segundo lugar, se estudió un gen de la familia de las proteínas small heat shock: *PpHsp16.4*, el cual fue seleccionado para su estudio por dos motivos. Por un lado, este gen estaba presente en una biblioteca de cDNA, enriquecida en secuencias pertenecientes a genes inducidos por ABA, generada en nuestro laboratorio en el marco de la tesis de maestría de Valentina Carballo (2006). En segundo lugar, *PpHsp16.4* codifica para una proteína pequeña de heat shock similar a *AtHSP17.6* de *A.thaliana*. El gen *AtHSP17.6* fue aislada previamente por el grupo del Dr. Szabados (Institute of Plant Biology, Biological Research Center), con quien nuestro grupo mantiene una fuerte colaboración. Este gen se aisló en *A.thaliana* utilizando una metodología desarrollada en el laboratorio del Dr. Szabados denominada COS (*Controlled cDNA Overexpression System*) (Abraham et al., 2008). Esta metodología permite identificar fenotipos deseados generados por sobreexpresión de genes de bibliotecas de cDNA. La sobreexpresión de *AtHSP17.6* resultó en plantas tolerantes a la salinidad y en menor sensibilidad al ABA (Papdi et al., 2008). Debido al pequeño tamaño del gen *AtHSP17.6* no ha sido posible identificar mutantes de *A.thaliana knockout* por inserción de T-DNA en este gen. En este sentido, *P.patens* ofrece ventajas importantes para el estudio del gen ortólogo a *AtHSP17.6*, debido a la posibilidad de generar mutantes *knockout* por recombinación homóloga en esta especie. De esta manera, en esta tesis se generó una construcción para la interrupción de *PpHsp16.4* y se generaron líneas mutantes *knockout* para este gen. Debido a la existencia de 2 genes idénticos ubicados en orientación opuesta en el genoma de *P.patens* (*PpHsp16.4a* y *PpHsp16.4b*), es que se seleccionaron líneas mutantes en cada uno de los genes y dobles mutantes, las cuales tienen expresión nula de *PpHsp16.4*. Los resultados de este trabajo fueron publicados en (Ruibal et al., 2013).

Por último, *PpCOR413* fue seleccionado en base a estudios de microarreglos que aportan datos de los perfiles de expresión global de *P.patens* frente a tratamientos con ABA y diversas condiciones de estrés abiótico (Cuming et al., 2007), se pudo observar que uno de los clones que mostró un grado de inducción importante frente al tratamiento con ABA, corresponde a un gen al que denominamos *PpCOR413*. La secuencia aminoacídica de *PpCOR413* indica que esta proteína de 258 aminoácidos tiene una localización cloroplástica predicha. Con el objetivo de evaluar la relevancia funcional de este gen, en este trabajo se

estudió experimentalmente la localización subcelular de la proteína y se generaron y caracterizaron mutantes *knockout* para el gen *PpCOR413* en *P.patens*

Resultados

1- Caracterización funcional de dehidrinas de *P. patens*

Una búsqueda en la base de datos de secuencias del genoma completo de *P. patens* (http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html y <http://www.phytozome.net/physcomitrella>) reveló la presencia de cuatro genes que codifican para DHNs clásicas y dos genes que codifican para proteínas muy similares a las DHNs. La primer DHN identificada en *P. patens*, fue identificada por nuestro grupo y denominada PpDHNA (Phypa_221321). *PpDHNA* codifica para una proteína de 59.4 kDa y contiene un segmento K y 11 segmentos repetidos Y (Saavedra et al., 2006). En esta proteína, los segmentos Y están insertos en una secuencia mayor repetida en 11 bloques de 33 a 35 aminoácidos, denominados segmentos G, que podrían formar una alfa-hélice anfipática clase A. Se ha descrito que dentro de cada uno de estos segmentos G existe cierto grado de similitud estructural con el segmento consenso K de plantas superiores. *PpDHNA* tiene homología con un gen, denominado *Tr288*, de otra briofita *Syntrichia ruralis* (Hedw.), un musgo de resurrección, cuya proteína se sintetiza durante la rehidratación de la planta (Velten y Oliver, 2001). PpDHNA y Tr288 tienen características estructurales en común con las DHNs de plantas superiores, además de ser inducidas por estrés abiótico.

Las otras secuencias de DHNs encontradas fueron denominadas en nuestro trabajo de la siguiente forma: PpDHNB (Phypa_173331), PpDHNC (Phypa_173172) y PpDHND (Phypa_235292) (Ruibal et al., 2012). La secuencia aminoacídica deducida de PpDHNB y PpDHNC indica que estas proteínas corresponden a DHNs de tipo K2, cuyos pesos moleculares son de 31.1 kDa y 25 kDa, respectivamente. PpDHNB tiene un segmento adicional cerca del extremo N-terminal de la proteína rico en treoninas y en aminoácidos polares, y carece del segmento phi, presente en algunas dehidrinas (Hughes y Graether 2010). Por otro lado, la secuencia aminoacídica predicha de PpDHNC contiene un dominio putativo metiltransferasa (MT), no descrito hasta el momento para ninguna dehidrina de otras especies vegetales. Por último, PpDHND codifica para una proteína de 19.5 kDa, y contiene un segmento conservado K en el extremo C-terminal.

Se encontraron también otras dos secuencias (Phypa_232091 y Phypa_163180), que codifican para proteínas de tipo DHNs, las cuales poseen segmentos K menos conservados. La secuencia aminoacídica deducida de la proteína Phypa_232091 corresponde a una proteína de 47.7 kDa, y comparte un 33% de identidad y un 44% de similitud con PpDHNA. Esta proteína contiene un segmento de tipo K en el extremo C-terminal. La proteína Phypa_163180 codifica para un polipéptido de 13.7 kDa, contiene un segmento tipo K atípico en el extremo N-terminal y es el único miembro de esta familia de proteínas de *P. patens* que contiene un segmento S, localizado en el extremo C-terminal de la proteína. Las características estructurales de esta última secuencia sugiere que este gen podría derivar de rearrreglos genómicos que resultaron en una dehidrina permutada.

Todos los miembros de la familia de DHNs de *P. patens*, excepto Phypa_163180, codifican proteínas acídicas. Se analizó la relación filogenética entre estas proteínas de *P. patens* y

las de otras plantas, incluyendo *A.thaliana* y el musgo *S.ruralis*, utilizando el alineamiento de las secuencias por ClustalW (Thompson et al., 1997) seguido por el algoritmo neighbor-joining empleando el programa MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). Las proteínas DHNs constituyen un grupo filogenéticamente heterogéneo. Esta extensa divergencia entre las DHNs, hasta en la misma especie vegetal, no permite obtener una conclusión filogenética confiable para esta familia de proteínas. Sin embargo, los resultados de este estudio claramente separan a PpDHNA de otras DHNs, y la posicionan en el mismo grupo que la rehydrina Tr288 de *S.ruralis*. En estos resultados también se puede ver que PpDHNB, PpDHNC y PpDHND se encuentran agrupados en un cluster formado por estas tres proteínas y la subclase de DHNs ácidas de *A.thaliana* (fig. 2A).

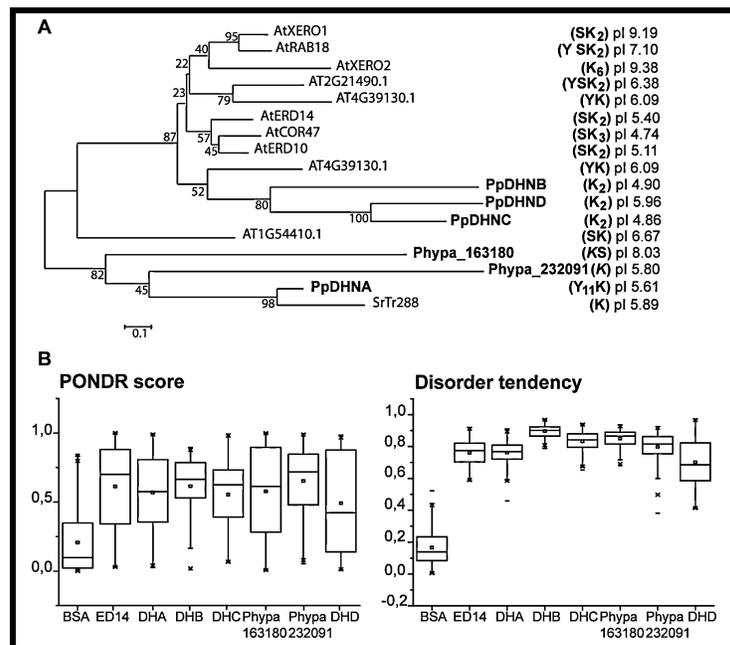


Figura 2: (A) Relación filogenética entre proteínas DHNs de *P.patens* (Pp), *A.thaliana* (At) y *S.ruralis* (Sr). El árbol filogenético fue construido por el método de neighbor-joining. Las proteínas de *P.patens* (PpDHNA (Phypa_221321), PpDHNB (Phypa_173331), PpDHNC (Phypa_173172), PpDHND (Phypa_235292), y proteínas del tipo DHN como Phypa_163180 y Phypa_232091) se encuentran en negrita. A la derecha se muestra los puntos isoeléctricos estimados (pI) y los tipos de estructuras de cada proteína, basado en la presencia de los segmentos conservados. (Y): segmento Y; (GY): segmentos conservados Y o Y-like, cada uno de ellos localizados en repetidos G; (K): segmento K; (S): segmento S. Los valores Bootstrap se muestran en cada nodo. La barra representa 0,1 sustituciones por posición de aminoácidos. (B) Se realizaron las predicciones *in silico* del desorden de las proteínas mediante algoritmos PONDR y IUPred, y se representaron los datos utilizando cajas en las cuales los valores de dispersión con un 25% el límite menor y 75% el límite mayor.

Mediante herramientas bioinformáticas se comparó la estructura de las seis DHNs de *P.patens* con la estructura de la proteína ERD14, una dehidrina de *A.thaliana* que se demostró mediante estudios bioquímicos y estructurales que es una proteína intrínsecamente desordenada (Kovacs et al., 2008; Ágoston et al., 2011). Mediante predicciones *in silico*, utilizando los programas PONDR (Romero et al., 2004) y IUPred (Dosztanyi et al., 2005), se pudo ver que las seis proteínas de *P.patens* son intrínsecamente desordenadas (fig. 2B y C, respectivamente). El puntaje promedio para sus secuencias aminoacídicas fue muy por debajo de 0.5, valor que separa las regiones

ordenadas de las desordenadas. Otra evidencia indirecta que indica que estas proteínas de *P.patens* poseen una estructura desordenada, es la baja movilidad de PpDHNA en SDS-PAGE y el patrón de corrida de estas proteínas, el cual posee una extensa proteólisis observado en Western blots (Saavedra et al., 2006). Esta última observación es típica de proteínas intrínsecamente desordenadas, las cuales son más accesibles que las proteínas globulares a ataques por proteasas (Kovacs et al., 2008).

PpDHNA y PpDHNB se inducen fuertemente por ABA, estrés salino y osmótico

Para caracterizar funcionalmente el rol de *PpDHNB*, se analizó el patrón de expresión de este gen y se comparó con el de *PpDHNA*, previamente descrito (Saavedra et al., 2006). La acumulación de ambos transcritos fue monitoreada por Northern blot luego de tratar la planta con ABA, estrés salino, estrés osmótico, o bajas temperaturas (fig. 3). Ambos genes se indujeron en respuesta a todas las condiciones de estrés, exceptuando los tratamientos con bajas temperaturas, en donde solamente se vio una leve inducción de *PpDHNB*.

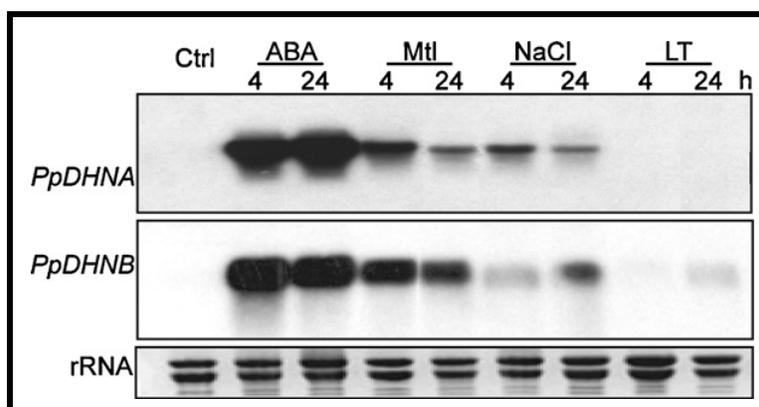


Figura 3: Análisis por Northern blot de los transcritos de *PpDHNA* y *PpDHNB*. 10µg de ARN total fue extraído de plantas controles sin tratar (Ctrl), o plantas incubadas en medio suplementado con 50µM ABA, 400mM Manitol (Mtl), 200mM NaCl o incubadas a bajas temperaturas (4°C), durante 4 y 24 horas (h), y analizado mediante Northern blot, utilizando como sonda de hibridación el cDNA completo de *PpDHNA* y *PpDHNB* marcados con [α^{32} P]-dCTP. El ARNr teñido con bromuro de etidio fue utilizado como control de carga de las muestras de ARN.

a) Generación, caracterización molecular y fenotípica de mutantes *knockout* de *PpDHNB* en *P.patens*

Para determinar la contribución individual en la tolerancia al estrés de *PpDHNB*, se generó un mutante *knockout* en esta planta, y se comparó con el mutante previamente generado en el gen *PpDHNA* (*dhnA*). Para ello se aprovechó la capacidad de *P.patens* para integrar eficientemente ADN foráneo mediante el proceso de recombinación homóloga. Se generó una construcción génica para la disrupción de *PpDHNB* mediante el clonado de dos secuencias del ADN genómico de este gen flanqueando un cassette de selección para el antibiótico hygromicina, tal como se muestra en la figura 4A. Se transformaron protoplastos de *P.patens* según describió Schaefer et al. en 1991, utilizando polietilenglicol (PEG) como agente químico para la permeabilización de la membrana plasmática. La regeneración de estos protoplastos fue exitosa, y se pudo observar el crecimiento de

varias colonias individuales en presencia de hygromicina. La caracterización molecular fue el paso inicial para luego realizar los análisis fenotípicos. Para ello se realizaron análisis por PCR de estas líneas resistentes, demostrando así que el gen *PpDHNB* ha sido interrumpido correctamente. Se realizaron diferentes PCRs utilizando combinaciones de primers diseñados ya sea por fuera como por dentro de la construcción de reemplazo alélica utilizada (fig. 4B). Se analizó la acumulación del transcripto de aquellas líneas de plantas cuyos productos de amplificación fueron los esperados (1042 pb y 1226 pb para los extremos 5' y 3' respectivamente) mediante Northern blot en respuesta a tratamientos con ABA (fig. 4C).

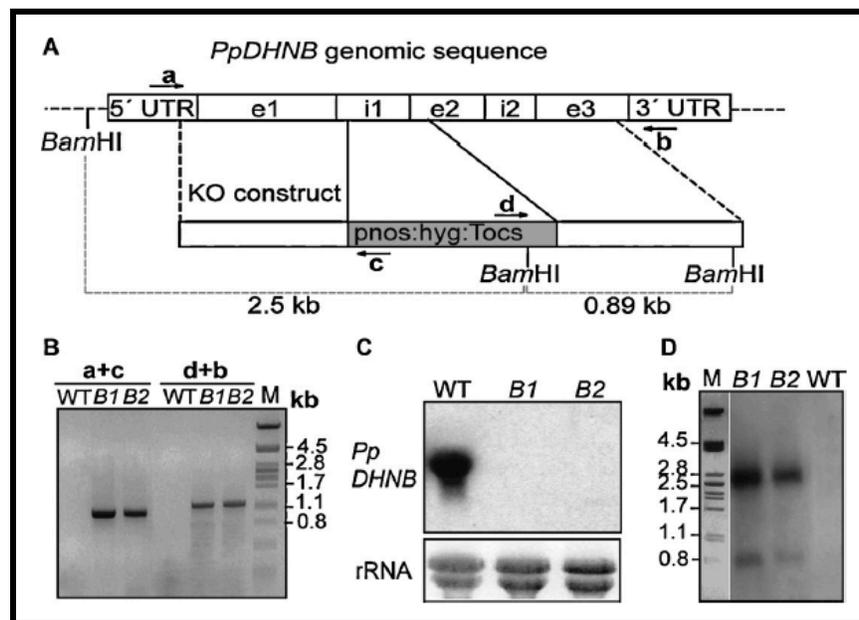


Figura 4: Construcción génica para la interrupción de *PpDHNB* y caracterización molecular de líneas mutantes. (A) Esquema de la secuencia genómica de *PpDHNB*. Exones (e1, e2 y e3) e intrones (i1 e i2) se encuentran marcados. La posición de los primers utilizados en los análisis de PCR de las plantas wt y mutantes utilizados en (B) se encuentran marcados por flechas. Tocs: terminador octopina sintasa, hyg: resistencia a hygromicina, pnos: promotor nopalina sintasa. (B) Los análisis por PCR de plantas salvajes (wt) y mutantes *dhnB-1* (B1) y *dhnB-2* (B2) fueron realizados utilizando 50ng de ADN genómico con los primers indicados en (A). M: Marcador de peso molecular. (C) Análisis por Northern blot de plantas salvajes y mutantes. Se aisló ARN total de plantas wt, B1 y B2, previamente tratadas con 50 μ M ABA por 24 horas. Se analizaron 10 μ g de ARN por Northern blot, utilizando como sonda la secuencia de cDNA completa de *PpDHNB*, marcada con α^{32} P-dCTP. Se utilizó el ARNr teñido con bromuro de etidio como control de carga. (D) Análisis por Southern blot de plantas wt, B1 y B2. El ADN genómico fue digerido con BamHI, separado en gel de agarosa, bloteado e hibridizado con una sonda correspondiente a la secuencia del cassette de selección hygromicina y marcada radiactivamente.

En base a los resultados obtenidos de los análisis de PCR y debido a la expresión nula del transcripto de *PpDHNB*, se pudieron encontrar dos líneas transgénicas independientes (*dhnB-1* y *dhnB-2*) mutantes para este gen. Por último, se realizaron estudios por Southern blot, para así poder demostrar que se integró únicamente una copia de la construcción en el genoma (fig. 4D). ADN genómico del genotipo salvaje y de los mutantes *dhnB-1* y *dhnB-2*, digeridos con la enzima de restricción BamHI fue separado en un gel de agarosa y transferido a una membrana de nylon. La membrana fue hibridada con una sonda marcada radiactivamente que consistió de un fragmento de ADN correspondiente al cassette de selección hygromicina. Tanto para *dhnB-1* como para

dhnB-2, la sonda detectó dos bandas de aproximadamente 2.5 y 0.9 kpb, las cuales son consistentes con los tamaños esperados que indican un único evento de integración. Estas dos líneas fueron consecuentemente utilizadas para los siguientes análisis fenotípicos.

PpDHNA y *PpDHNB* son ambos importantes en la tolerancia al estrés salino y osmótico en *P.patens*

Para obtener datos funcionales del rol individual que cumplen estas DHNs durante el estrés, se crecieron colonias de los mutantes *dhnB* y *dhnA* y se comparó el crecimiento de ambas en condiciones normales y de estrés moderado o severo de salinidad (NaCl 200mM o NaCl 500mM) y de estrés osmótico (Manitol 400mM o 900mM) con las plantas del genotipo salvaje. Debido a que se obtuvieron resultados similares para *dhnB-1* y *dhnB-2*, es que solamente se muestran los resultados comparando *dhnA* y *dhnB-1*.

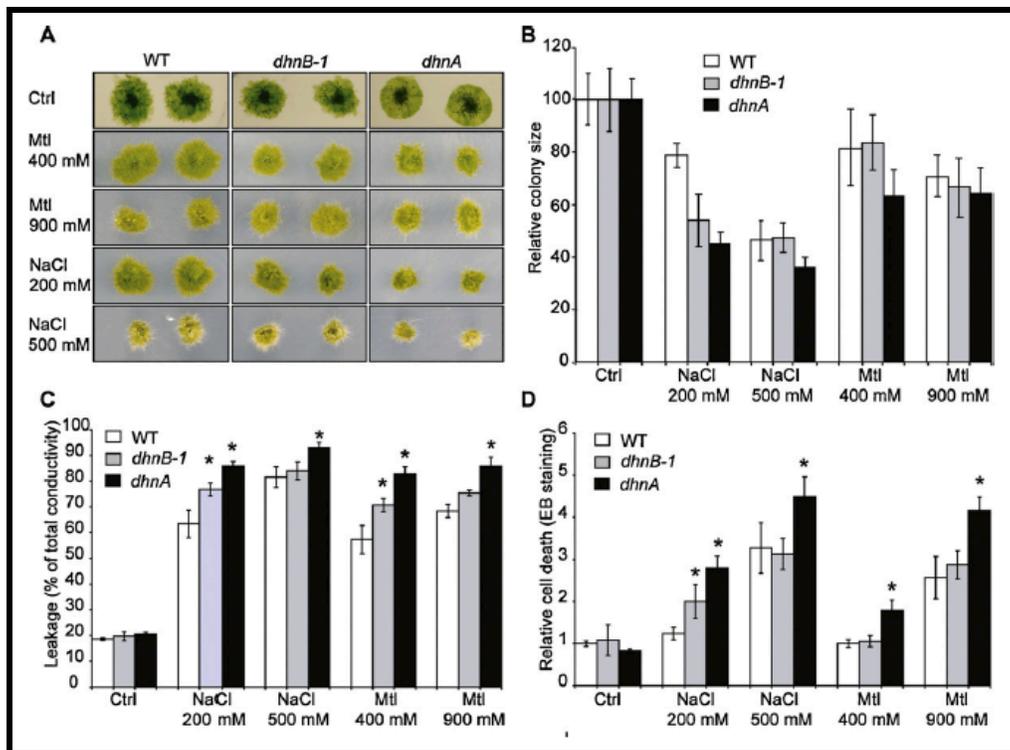


Figura 5: Efecto del estrés salino y osmótico en plantas *P.patens* salvajes y mutantes. (A) Comparación fenotípica de plantas salvajes (wt), *dhnB1* y *dhnA* crecidas en condiciones normales (Ctrl), en medio suplementado con 400mM o 900mM de Manitol (Mtl), o con 200mM o 500mM de NaCl. Las plantas fueron fotografiadas luego de 20 días. (B) Análisis cuantitativo de las plantas crecidas bajo estrés salino y osmótico. Imágenes fotográficas de 12 colonias individuales para cada tratamiento fueron analizadas por ImageJ. Los datos se expresan como un porcentaje de los valores obtenidos a partir de cada genotipo crecido en condiciones óptimas, que se establece como 100%. (C) Medida de conductividad de membrana de plantas salvajes (wt) y *dhnB1* y *dhnA*. Las colonias se crecieron en condiciones normales durante 21 días y se transfirieron a medio normal (Ctrl) o suplementado con NaCl (200mM o 500mM) o con manitol (Mtl 400mM o 900mM). Las medidas fueron realizadas 3 días después del tratamiento. Las barras de error indican SD (n=3). (D) Cuantificación de muerte celular por tinción con Evans Blue. Plantas salvajes y mutantes fueron crecidas en medio normal y pasadas a estrés como se describe anteriormente. Las tasas de muerte celular se estimó midiendo la absorbancia a 600nm después de la tinción con Evans blue. Los valores para cada genotipo se expresan en relación con el valor de absorbancia obtenido para la muestra de control de tipo salvaje. Las barras de error indican SD (n=3). Las diferencias significativas de al menos 0,05 nivel de confianza entre los de tipo salvaje y las líneas mutantes están marcados con un *.

Tal como se muestra en la figura 5A y 5B, el crecimiento de las plantas bajo condiciones de estrés severo se vio afectado de manera similar entre los diferentes genotipos. Sin embargo, bajo condiciones de estrés salino u osmótico moderados (NaCl 200mM y Manitol 400mM), tanto *dhnA* como *dhnB* mostraron una reducción significativa en su crecimiento, comparados con el genotipo salvaje. Para obtener datos cuantitativos del efecto del estrés salino y osmótico en los diferentes genotipos, las plantas fueron crecidas durante 20 días en condiciones normales y luego transferidas a condiciones de estrés salino y osmótico moderados y severos. Tres días luego de los tratamientos, se analizó el daño celular a nivel de la membrana plasmática mediante medidas de pérdida de iones (fig. 5C). Tanto las plantas salvajes como las mutantes pierden aproximadamente un 20% de su contenido total de electrolitos cuando se encuentran en condiciones normales. Sin embargo, los niveles de electrolitos perdidos son significativamente elevados en ambos mutantes comparados con las plantas salvajes luego de los tratamientos moderados con estrés salino y osmótico. La diferencia entre las plantas salvajes y los mutantes de las DHNs fue significativo en todos los casos, evaluado mediante el test de Turkeys. Ambos mutantes mostraron mayores signos de daño celular que el genotipo salvaje en condiciones de estrés, a juzgar por el porcentaje de pérdida de iones (fig. 5C), así como el grado de muerte celular determinado por tinción con el colorante Evans Blue (fig. 5D). Los resultados también mostraron que frente a todos los tratamientos ensayados, el genotipo *dhnA* fue el más afectado.

Estos resultados indican que tanto *PpDHNA* como *PpDHNB* cumplen un rol importante en prevenir el daño celular inducido por el estrés. Está claro que en *P.patens*, *PpDHNA* contribuye en mayor medida a la tolerancia al estrés que *PpDHNB*.

b) Otros efectos de la mutación en *PpDHNA*

Originalmente, este proyecto tenía como objetivo generar un doble mutante *knockout* para los genes *PpDHNA* y *PpDHNB* en *P.patens*. Con esa finalidad, al realizar la construcción de reemplazo para *PpDHNB* se utilizó un vector con resistencia al marcador de selección higromicina, para así poder incorporar esta construcción para el reemplazo de *PpDHNB* en el background del mutante *dhnA*, que expresa resistencia a G418. Luego de numerosos intentos de generación de protoplastos a partir del genotipo *dhnA*, no fue posible obtener una concentración adecuada de células para la transformación (fig. 6).

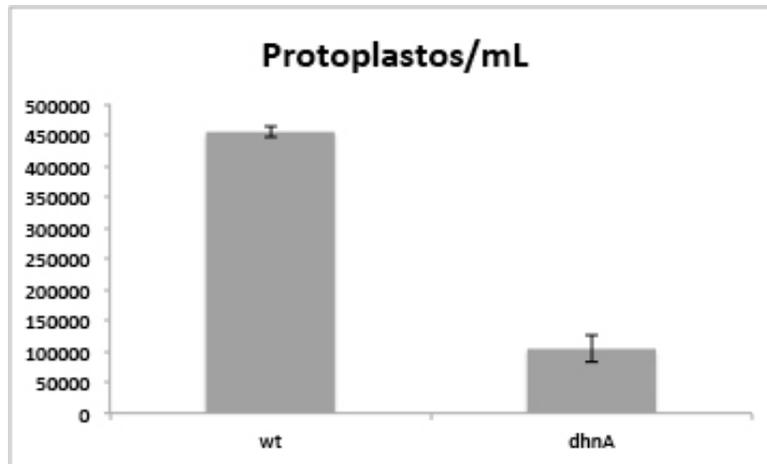


Figura 6: Número de protoplastos por mL. Se utilizó tejido protonema obtenido a partir de 5 mL de material vegetal homogeneizado con ultraturrax, de cada genotipo, salvaje y mutante *dhnA*, en una placa de Petri con medio Hoagland's, durante 7 días. Se digirió cada genotipo con 7 mL de solución de digestión (1% driselasa en 8% manitol) durante toda la noche en oscuridad y se contó la cantidad de protoplastos total generados en una cámara de Neubauer. La cantidad final de protoplastos fue calculada por mL totales de suspensión diluidos en manitol 8%.

Los filamentos de protonema permanecían enteros en el mutante, a diferencia del genotipo salvaje, en donde los mismos eran completamente digeridos. Por lo tanto, la escasa cantidad de protoplastos obtenida a partir del genotipo mutante no era debida a la muerte de las células, sino a la incapacidad del tejido vegetal de ser digerido por la mezcla enzimática utilizada para hidrolizar la pared celular (Driselasa). Esto nos llevó a pensar en la hipótesis de que el mutante *dhnA* podría tener alterada de alguna manera la pared celular, imposibilitando así la digestión de la misma por parte de la Driselasa. Para evaluar si las plantas mutantes *dhnA* podrían tener modificaciones a nivel de la pared celular, se estudió la acumulación de calosa en el mutante y en las plantas salvajes. La calosa es un polímero compuesto por β -(1,3)-glucanos que sirven como matriz, donde los compuestos antimicrobianos son depositados, y sirven como defensa química durante el ataque de patógenos (Luna et al., 2011). Para analizar si existía alguna diferencia entre la cantidad de depósitos de calosa en las paredes celulares del genotipo salvaje y del genotipo mutante, se realizaron tinciones de los tejidos vegetales de ambos genotipos, con el colorante Anilina Blue, el cual tiñe los glucanos de este polímero, y se observó en un microscopio de epifluorescencia con luz UV (Schuette et al., 2009) (fig. 7A).

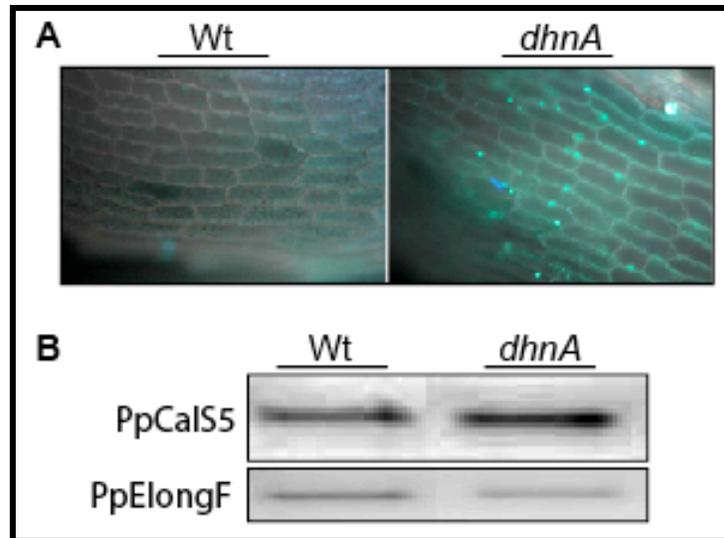


Figura 7: Deposición de calosa en *P.patens*. (A) Visualización en microscopio de fluorescencia utilizando filtro UV de gametofitos de plantas salvajes (wt) y mutantes *dhnA*. Se crecieron colonias durante 20 días en condiciones normales y fueron tratadas con el colorante Anilina Blue, permitiendo la tinción de los glucanos que constituyen la calosa. (B) Análisis por transcripción reversa de plantas salvajes y mutantes *dhnA*, utilizando ARN total aislado de plantas controles. El ARN fue aislado y retrotranscrito a cDNA, lo cual fue utilizado como molde para la reacción de PCR. Se utilizó como primer secuencias forward y reverse del gen *PpCalS5* y del factor de elongación como gen constitutivo como control de carga.

Por otro lado, también se analizó mediante RT-PCR el nivel de acumulación del transcrito codificante para una de las enzimas que media la síntesis de calosa, denominada calosa sintasa (CalS). Esta enzima se está codificada por una familia de genes, y el genoma de *P.patens* contiene 12 de éstos (Schuette et al., 2009), de los cuales *CalS5* sería el gen predominante en sintetizar este polímero en el polen de angiospermas (Abercrombie et al., 2011).

Como se puede ver en la figura 7, el mutante *dhnA* acumula más calosa en las paredes celulares que las plantas salvajes, en condiciones normales. Esto se pudo demostrar no solamente mediante la visualización en un microscopio confocal de las plantas teñidas con Anilina Blue, sino que también mediante la mayor acumulación del transcrito de *PpCalS5* en este genotipo (fig. 7A y B).

Con esta hipótesis decidimos evaluar la susceptibilidad de este mutante frente a la infección con el hongo *Pythium irregulare*, patógeno necrótrofo capaz de infectar el tejido de *P.patens* causando síntomas de enfermedad y activando respuestas de defensa en la planta (Oliver et al., 2009; Ponce de León et al., 2007). Como este proceso de modificación de la pared celular afecta la infección por este patógeno, se comparó la capacidad infectiva de *Pythium* entre los diferentes genotipos. Para ello, se crecieron plantas salvajes y mutantes *dhnA* en condiciones normales, y a los 20 días de crecidas se trataron con el hongo *Pythium*, crecido previamente en medio PDA durante 5 días. Luego de 48 horas de infección, el cual se realiza levantando una porción del medio PDA con el hongo crecido y depositándolo encima de cada colonia de manera que quede en contacto con la planta, se pueden ver síntomas de la infección del hongo (fig. 8).

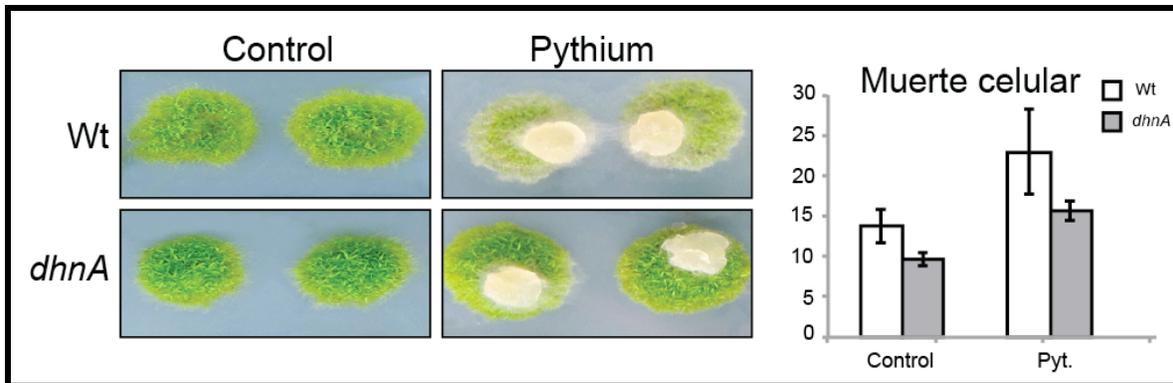


Figura 8: Infección de *P.patens* con *Pythium irregulare*. Colonias del genotipo salvaje (wt) y mutantes *dhnA* fueron crecidas en condiciones normales durante 20 días (control) y luego tratadas con el hongo *Pythium*. Se observaron los síntomas de la infección del hongo sobre la colonia y se realizó la cuantificación de la muerte celular mediante tinción con Evans Blue.

Los resultados de estos tratamientos determinaron que las plantas mutantes fueron más resistentes a *Pythium* comparado con las plantas salvajes, lo cual fue cuantificado mediante medidas de muerte celular por tinción con Evans Blue (fig. 8).

c) Analizar *in vitro* las propiedades bioquímicas de PpDHNA.

Si bien nuestros trabajos han demostrado que PpDHNA participa en la tolerancia al estrés osmótico y salino, el mecanismo de acción mediante el cual esta proteína actúa no ha sido descrito aún. Estudios realizados en otras plantas sugieren varias posibles funciones bioquímicas para las dehidrasas, como por ejemplo estabilizar membranas, o que actúen como chaperonas (Rorat, 2006; Tunnacliffe y Wise 2007). Para poder estudiar el posible mecanismo de acción de PpDHNA, es que se estudió la expresión del gen en respuesta a otras condiciones de estrés no analizadas anteriormente, como por ejemplo frente al tratamiento con el agente reductor DTT, y se comparó la expresión del gen con el patrón de expresión obtenido frente a los tratamientos de estrés salino, osmótico y frío. Para ello, se extrajo ARN mensajero de plantas salvajes tratadas con Manitol (400mM), NaCl (200mM) durante 24 horas, condiciones en las cuales se induce la expresión de este gen (fig. 3), y se comparó con tratamientos con bajas temperaturas (4°C), para corroborar la nula expresión con respecto a los estudios de expresión génica anteriores, y tratamientos con 10mM de DTT, durante 24 horas. Como se puede ver en la figura 9A, además de inducirse en respuesta al estrés osmótico y salino, *PpDHNA* tiene una leve inducción cuando se realizan los tratamientos con DTT, agente químico desnaturante de proteínas.

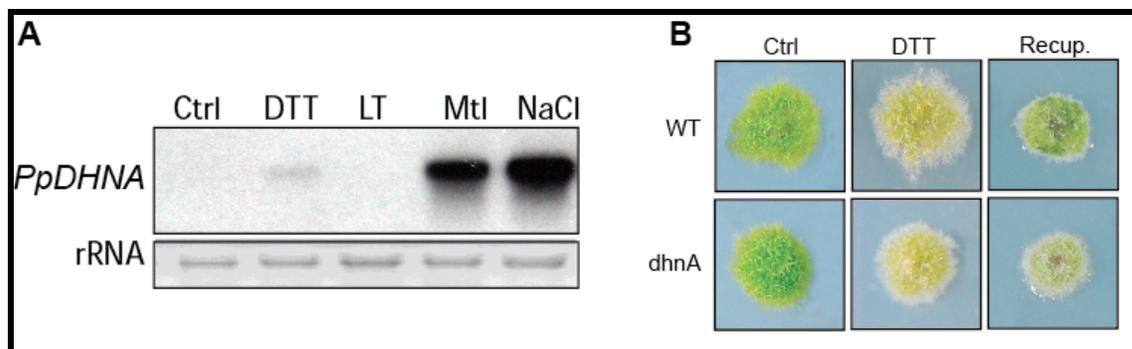


Figura 9: Tratamientos de plantas de *P.patens* con DTT. (A) Análisis por Northern blot de los transcritos de *PpDHNA*. 10µg de ARN total fue extraído de plantas controles sin tratar (Ctrl), o plantas incubadas durante 24 horas en medio suplementado con 10mM de DTT, 400mM Manitol (Mtl), 200mM NaCl o incubadas a bajas temperaturas (LT), y analizado mediante Northern blot, utilizando como sonda de hibridación el cDNA completo de *PpDHNA* marcada con [α^{32} P]-dCTP. El ARNr teñido con bromuro de etidio fue utilizado como control de carga de las muestras de ARN. (B) Comparación fenotípica de plantas salvajes (wt) y mutantes *dhnA*. Las plantas se crecieron en medio normal (Ctrl), y luego de 20 días se transfirieron a un medio suplementado con 10mM de DTT y se dejaron crecer durante 10 días. Se transfirieron a medio normal y se fotografiaron a los 5 días de recuperación.

Esta inducción de *PpDHNA* luego de tratamientos con DTT, nos llevó a analizar el fenotipo de las plantas salvajes y mutantes cuando se agrega este agente reductor al medio de crecimiento. Para ello, se crecieron ambos genotipos en condiciones normales durante 20 días y luego se transfirieron a un medio suplementado con 10mM de DTT. Aunque luego de 10 días no se ven diferencias fenotípicas entre las plantas salvajes y las mutantes (fig. 9B), cuando se transfirieron a medio normal para permitir su recuperación, las plantas salvajes se recuperaron luego de 5 días mientras que las mutantes *dhnA* no lo hicieron. Esto estaría sugiriendo que *PpDHNA* podría estar cumpliendo una función importante en estabilizar otras proteínas durante los tratamientos con este agente desnaturalizante, actuando como posible chaperona.

Con el objetivo de evaluar si *PpDHNA* ejerce una función de protección sobre otras proteínas frente a agentes desnaturalizantes, se expresó este gen en *E.coli* y se purificó la proteína recombinante para evaluar su actividad *in vitro*. Los ensayos de protección se realizaron utilizando la proteína lisozima, por ser una enzima que fácilmente puede medirse su actividad en el tiempo y porque la misma es sensible a la temperatura y a agentes reductores, ya que tiene cuatro enlaces disulfuro. Se utilizó TCEP (tris-2-carboxyethyl-phosphine), como agente reductor, ya que este compuesto resultó ser más eficiente que el DTT en la desnaturalización de la lisozima.

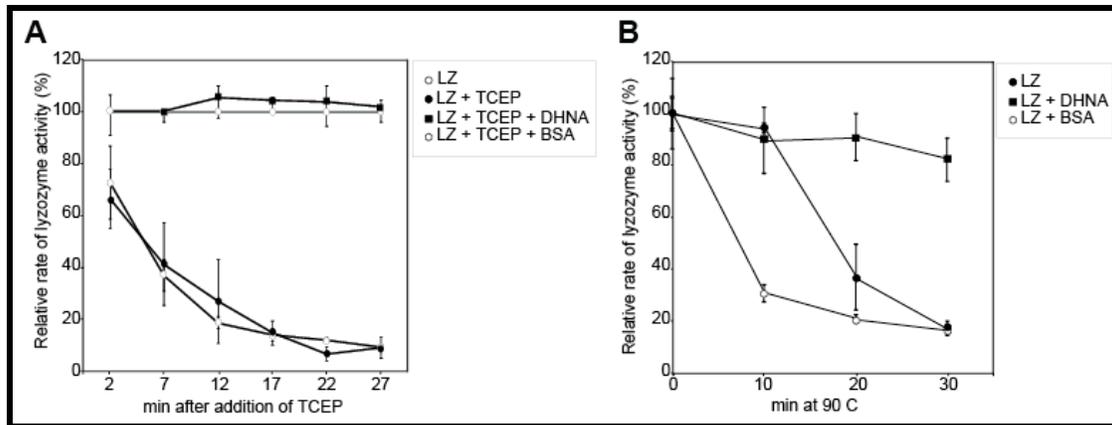


Figura 10: Actividad relativa de la proteína lisozima. Se realizaron reacciones de desnaturalización de la lisozima mediante agregado del agente químico TCEP (A) o con incubación con altas temperaturas (B). La actividad de la enzima fue calculada cuando la lisozima se encuentra sola, enzima + TCEP, enzima + TCEP + DHNA, o enzima + TCEP + BSA. De la misma manera se calculó la actividad de la lisozima cuando ésta se incubó durante 30 minutos a 90°C, incubando la enzima + DHNA o la incubación de la enzima + BSA. LZ: lisozima; TCEP: tris-2-carboxyethyl-phosphine; DHNA: PpDHNA; BSA: bovine serum albumin.

En la figura 10 se muestra la medida de actividad de la lisozima en el tiempo, luego de ser incubada con TCEP (fig. 10A) o incubada a 90°C durante 30 minutos (fig. 10B). Como se puede ver, cuando se agrega TCEP a la enzima, ésta se desnaturaliza rápidamente perdiendo así toda su actividad luego de 20 minutos de incubación. Sin embargo, cuando se agrega a la misma reacción la proteína purificada PpDHNA, la actividad de la lisozima permanece intacta, manteniendo el 100% de su actividad. De manera similar, cuando se incuba la lisozima a altas temperaturas, la actividad de ésta disminuye al 20% luego de 20 minutos de incubación, mientras que cuando se agrega la proteína PpDHNA a la reacción, la actividad de la misma permanece cercana al 90%. Para ambos casos se utilizó BSA como proteína control, la cual no afectó la actividad de la lisozima ni con agregados de TCEP ni con altas temperaturas. Es importante destacar que no fue necesario el agregado de PpDHNA en exceso para mantener la actividad de la lisozima. De hecho, los resultados mostrados fueron obtenidos utilizando una relación molar 1:5 de PpDHNA:lisozima.

Con estos estudios queda claro que PpDHNA tiene un rol tipo chaperona, y actuaría estabilizando otras proteínas durante condiciones de estrés. Queda determinar a qué tipo de proteínas se une, y si PpDHNB cumple una función similar. Para ello ya se dispone de una construcción, realizada en el marco de mi tesis de grado (Tesis de grado, Ruibal 2006) para la expresión de esta segunda dehidrina en un sistema bacteriano. Se encuentra actualmente en estudio la comparación de ambas dehidrinas de *P.patens* con dos dehidrinas de *A.thaliana*, LTI29 y LTI30.

d) Sobreexpresión, caracterización molecular y fenotípica de YFP:PpDHNA e YFP:pDHNB en *A.thaliana*

Los análisis de los mutantes *knockout dhna* y *dhnb* mostraron que estas dehidrinas son importantes para sobrellevar el estrés osmótico y salino en *P.patens* (fig. 5), y fundamentalmente durante la recuperación del estrés. Para estudiar el efecto de estas proteínas en plantas superiores, se generaron líneas de *A.thaliana* que sobreexpresan las

proteínas PpDHNA o PpDHNB, fusionadas a la proteína fluorescente YFP en el extremo N-terminal, y controladas por el promotor constitutivo 35S (YFP:PpDHNA e YFP:pDHNB). Las semillas obtenidas de las transformaciones utilizando el método de agroinfiltración de flores (Clough y Bent 1998), fueron germinadas en presencia del agente selector (kanamicina) y la tercera generación homocigota para las construcciones fue caracterizada a nivel molecular. Diez líneas transgénicas fueron analizadas en cuanto a la acumulación de las proteínas recombinantes mediante Western blot, utilizando anticuerpos específicos anti-PpDHNA y anti-GFP para detectar las fusiones YFP:PpDHNA o YFP:PpDHNB, respectivamente (fig. 11A). Por otro lado también se realizaron ensayos de Northern blot utilizando como sonda los cDNAs completos de cada dehidrina, con el fin de evaluar el nivel de expresión de los transgenes (fig. 11B). Por último, también se verificó el número de inserciones del transgen de interés en el genoma de *A.thaliana* mediante Southern blot (datos no mostrados). En base a los resultados de la caracterización molecular, se seleccionaron tres líneas independientes que sobreexpresaron altos niveles de expresión de cada una de las dehidrina, las cuales fueron utilizadas para los posteriores análisis fenotípicos.

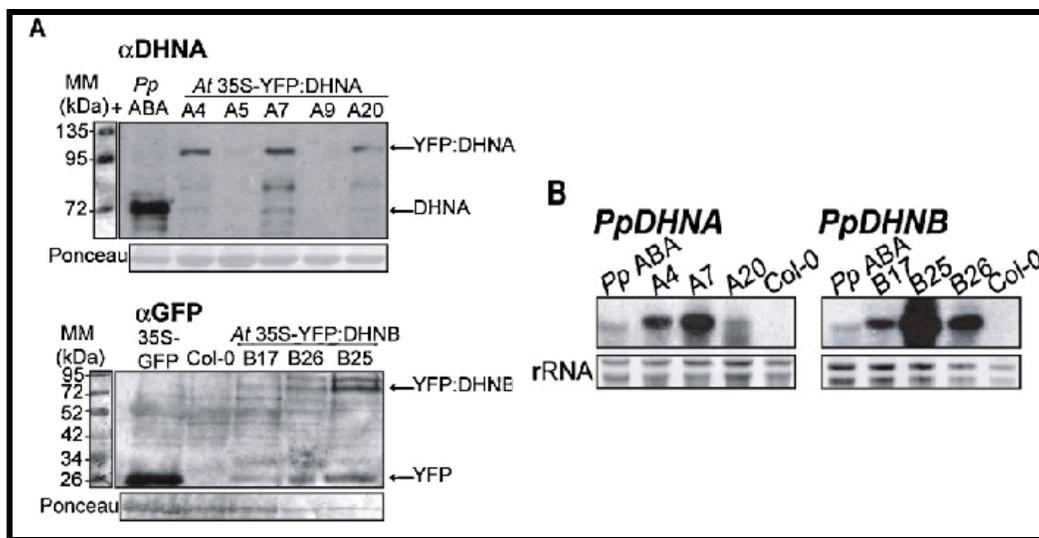


Figura 11: Caracterización molecular de plantas de *A.thaliana* que sobreexpresan las fusiones 35S:YFP:PpDHNA y 35S:YFP:PpDHNB. (A) Detección de las proteínas de fusión 35S:YFP:PpDHNA (A4, A5, A7, A9, A20) y 35S:YFP:PpDHNB (B17, B26, B25) en plantas de *A.thaliana* mediante Western blot. 10µg de proteínas solubles totales fueron extraídas y separadas en geles de SDS-PAGE, se blotearon en membranas de nitrocelulosa e hibridaron utilizando anticuerpos específicos anti-PpDHNA y anti-GFP para detectar 35S:YFP:PpDHNA y 35S:YFP:PpDHNB, respectivamente. Como controles positivos se utilizaron muestras de proteínas de plantas de *P.patens* tratadas con 50µM de ABA durante 24 horas (Pp ABA) y proteínas de plantas de *A.thaliana* que expresan GFP constitutivamente, para PpDHNA y PpDHNB respectivamente. (B) Análisis por Northern blot de plantas de *A.thaliana* salvajes (Col-0) y transgénicas. Se analizaron 10 µg de ARN de plantas Col-0 y sobreexpresantes de PpDHNA y PpDHNB, utilizando como sonda la secuencia completa de cDNA de PpDHNA y PpDHNB, marcadas con α^{32} P-dCTP. Se utilizó el ARNr teñido con bromuro de etidio como control de carga.

PpDHNA tiene un peso molecular de 59.4 kDa, sin embargo, migran en un gel SDS-PAGE como una proteína de 72 kDa (fig. 11A). Este aumento en el peso molecular es aparentemente típico de las proteínas intrínsecamente desordenadas. La banda correspondiente a 95 kDa corresponde a la fusión YFP:PpDHNA en las líneas transgénicas A4, A7 y A20, las cuales fueron elegidas para los posteriores análisis fenotípicos. Este

tamaño es consistente con los tamaños esperados de las proteínas de fusión, debido a que YFP posee un tamaño de 26.9 kDa. De modo similar, para la detección de la proteína de fusión YFP:PpDHNB se utilizó el anticuerpo específico comercial anti-GFP, y se detectó una banda de 72 kDa en tres líneas sobreexpresantes (fig. 11A). Basado en los niveles de acumulación se seleccionaron las líneas B17, B25 y B26 para posteriores análisis fenotípicos. A7 y B25 fueron las líneas que mostraron mayor acumulación de PpDHNA y PpDHNB respectivamente. Los niveles de expresión a nivel de proteínas fueron consistentes con los niveles de expresión observados en los ensayos por Northern blot (fig. 11B).

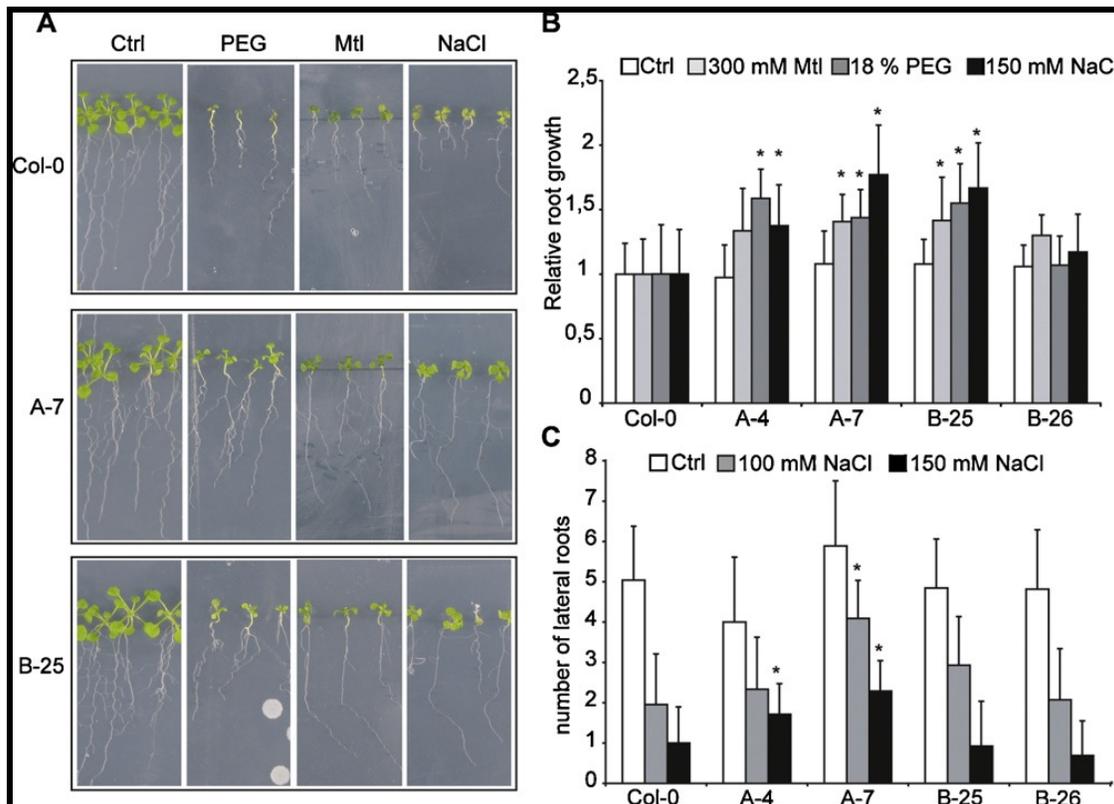


Figura 12: Evaluación del crecimiento de las raíces de las plantas sobreexpresantes y salvajes en condiciones de estrés osmótico y salino. (A) Crecimiento radicular de plantas de *A.thaliana* salvajes (Col-0) y transgénicas que sobreexpresan 35S:YFP:DHNA (A-7) y 35S:YFP:DHNB (B-25) en condiciones normales (Ctrl) y en medios suplementados con 18% de PEG, Manitol 300mM (Mtl) y NaCl 150mM. (B) Análisis cuantitativo de la elongación de las raíces. Medida del incremento diario relativo de la longitud de la raíz. El asterisco (*) indica diferencias significativas a 0.05 de nivel de confianza. (C) Medida del número de raíces laterales de plantas salvajes y transgénicas crecidas en presencia de 100mM y 150mM de NaCl durante 10 días.

Las plantas sobreexpresantes no mostraron diferencias morfológicas o en el desarrollo comparadas con las plantas salvajes (Col-0) (fig. 12A). Se analizó el efecto del estrés osmótico y salino en el crecimiento de las raíces mediante la medición del largo de las mismas, tanto en las líneas transgénicas como en las salvajes, luego de 8 días de crecimiento en condiciones normales o en medios suplementados con 300mM de manitol, 18% de PEG o 150mM de NaCl. Mientras que en condiciones de estrés osmótico o salino se inhibe casi completamente el crecimiento radicular en las plantas salvajes, en las líneas

que sobreexpresan PpDHNA se puede observar un crecimiento significativo de las raíces (fig. 12A). Por otro lado, las diferencias en el crecimiento de las raíces en las líneas que sobreexpresan PpDHNB fue menor, aunque mayor que la línea salvaje (fig. 12A y B). Además de esto, también se evaluó el crecimiento lateral de las raíces en medio suplementado con NaCl 100mM y 150mM, observándose un mayor crecimiento tanto en condiciones normales como durante el estrés de ambos sobreexpresantes, siendo mayor el del sobreexpresante de PpDHNA (fig. 12C).

En segundo lugar se analizó el crecimiento general de las plantas en condiciones normales y durante el estrés osmótico (fig. 13). Para ello se crecieron las plantas en medio normal y a los 5 días se transfirieron a medio suplementado con 250mM de Sorbitol o 18% de PEG. Las plantas que sobreexpresan PpDHNA mostraron una mejoría significativa en la tasa de crecimiento bajo estas condiciones (fig. 13A). A pesar de que tanto el peso fresco como el crecimiento de las rosetas durante el estrés osmótico fue menor en todos los casos comparados con los controles, estos parámetros se redujeron en las plantas que sobreexpresan PpDHNA (fig. 13B y C). Este efecto fue además proporcional al nivel de acumulación de PpDHNA. Los valores mayores de crecimiento bajo estrés se obtuvieron en las líneas A7, la cual acumula mayores niveles de PpDHNA. En contraste, las diferencias entre el crecimiento de la roseta y el peso fresco en las líneas que acumulan PpDHNB bajo estrés osmótico fue mucho menor comparado con las que sobreexpresan PpDHNA, pero mayor comparado con las salvajes.

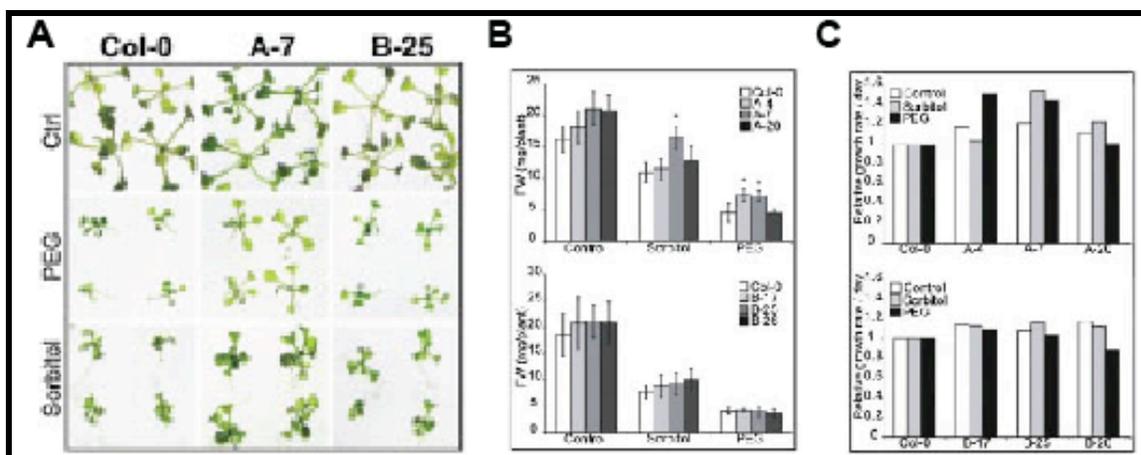


Figura 13: Crecimiento de *A.thaliana* en condiciones de estrés osmótico. (A) Plantas de 5 días de crecidas en medio normal fueron transferidas a medio suplementado con 250mM de Sorbitol o 18% de PEG y se dejaron crecer durante 12 días, fotografiándose cada 3 días. (B) Medidas de peso fresco en plantas salvajes (Col-0) y que sobreexpresan las construcciones génicas YFP:DHNA (A-4, A-7, A-20) e YFP:DHNB (B-17, B-25, B-26), luego de crecidas durante 12 días en condiciones normales o en los medios suplementados con Sorbitol o PEG. (C) Análisis cuantitativo del tamaño de las rosetas de las plantas crecidas en condiciones normales o en los medios con estrés osmótico. Imágenes fotográficas de 20 plántulas para cada tratamiento fueron cuantificadas mediante el software ImageJ. Los datos se encuentran expresados en valores relativos comparados con la tasa de crecimiento de las plantas salvajes. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas a un nivel de confianza de 0.05.

En trabajos anteriores se demostró que PpDHNA es indispensable para que *P.patens* pueda recuperarse de un estrés salino u osmótico severo (Saavedra et al., 2006). Para evaluar si la sobreexpresión de PpDHNA, y eventualmente de PpDHNB podía influir en la

capacidad de recuperación del estrés en *A.thaliana*, las plantas transgénicas fueron sometidas a condiciones de estrés salino u osmótico severo, 150mM de NaCl o 400mM de sorbitol, respectivamente, durante 8 días, y luego fueron transferidas a condiciones óptimas de crecimiento. Al cabo de 10 días de recuperación del estrés, se evaluó la tasa de supervivencia (fig. 14). Las altas concentraciones de sal como de sorbitol redujeron la viabilidad de las plantas salvajes en un 89% y 46% respectivamente, mientras que las plantas que expresan PpDHNA o PpDHNB se recuperaron más fácilmente de ambos tipos de estrés. PpDHNA y PpDHNB mejoraron la supervivencia de las plantas al estrés por sal en un 53% y 33% respectivamente, mientras que cerca del 100% de las plantas transgénicas sobrevivieron al estrés osmótico con sorbitol 400mM (fig. 14). Estos datos sugieren que las dehidrinas son importantes para preservar la viabilidad de las plantas superiores en condiciones ambientales severas.

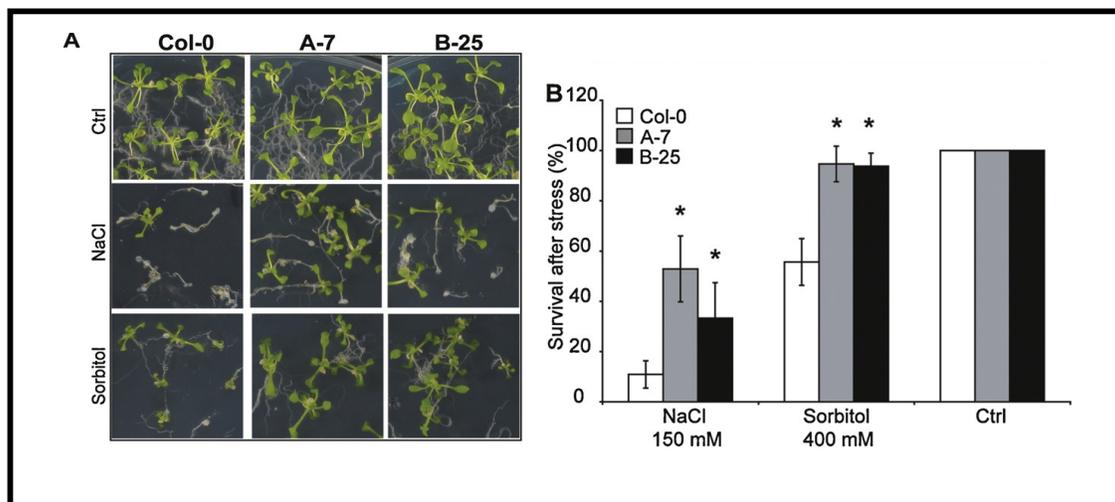


Figura 14: Supervivencia al estrés osmótico y salino de plantas de *A.thaliana* sobreexpresantes. (A) Se traspasaron plantas de 7 días crecidas en medio normal a medio de cultivo líquido suplementado con NaCl 150mM o 400mM de Sorbitol durante 8 días y luego se transfirieron a un medio de crecimiento normal, fotografiando luego de 10 días de crecimiento. (B) Evaluación cuantitativa de la recuperación de las plantas luego del estrés salino y osmótico. Porcentaje de plántulas que fueron capaces de sobrevivir. Asterisco (*) indica diferencias significativas al 0.05 de nivel de confianza.

En conclusión, nuestros resultados mostraron que ambas dehidrinas son efectivas para preservar la viabilidad de las plantas en condiciones de estrés osmótico y salino. Aunque la sobreexpresión de ambas dehidrinas fueron capaces de mejorar el crecimiento y la recuperación de las plantas, PpDHNA fue más eficiente en aumentar la tolerancia en este sistema heterólogo.

Ambas dehidrinas se localizan en el citosol de las células vegetales

Se ha visto que las dehidrinas se localizan en diferentes compartimentos celulares, entre los cuales se encuentra el citosol, núcleo, vacuola, mitocondria, la vecindad de la membrana plasmática y en la pared celular (Houde et al., 1995; Rorat et al., 2004; Danyluk et al., 1998; Egerton-Warburton et al., 1997; Borovskii et al., 2000; Heyen et al., 2002; Layton et al., 2010).

Diferentes herramientas bioinformáticas que predicen la presencia de péptidos señales sugieren que tanto PpDHNA como PpDHNB se localizarían en el núcleo o en el citosol de las células vegetales. Debido a que el segmento K forma alfa-hélices anfipáticas, se ha visto que este tipo de proteínas interactúan con componentes lipídicos de las membranas y también con sitios hidrofóbicos de proteínas parcialmente desnaturadas (Close 1996; 1997; Mayhew y Hartl 1996). Por otro lado, también se ha demostrado que el segmento S podría estar involucrado en la localización nuclear, debido a sus residuos de serina, blancos de fosforilación (Godoy et al., 1994; Jensen et al., 1998; Plana et al., 1991; Lisse et al. 1996), en la posible relocalización de algunas dehidrinas hacia este compartimento. Con el objetivo de determinar la localización subcelular de estas proteínas, es que se realizaron las plantas transgénicas de *A.thaliana* que sobreexpresan ambas dehidrinas fusionadas con la proteína fluorescente YFP. Las hojas de estas plantas fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia confocal, evaluando además posibles cambios en la localización subcelular bajo diferentes condiciones de estrés.

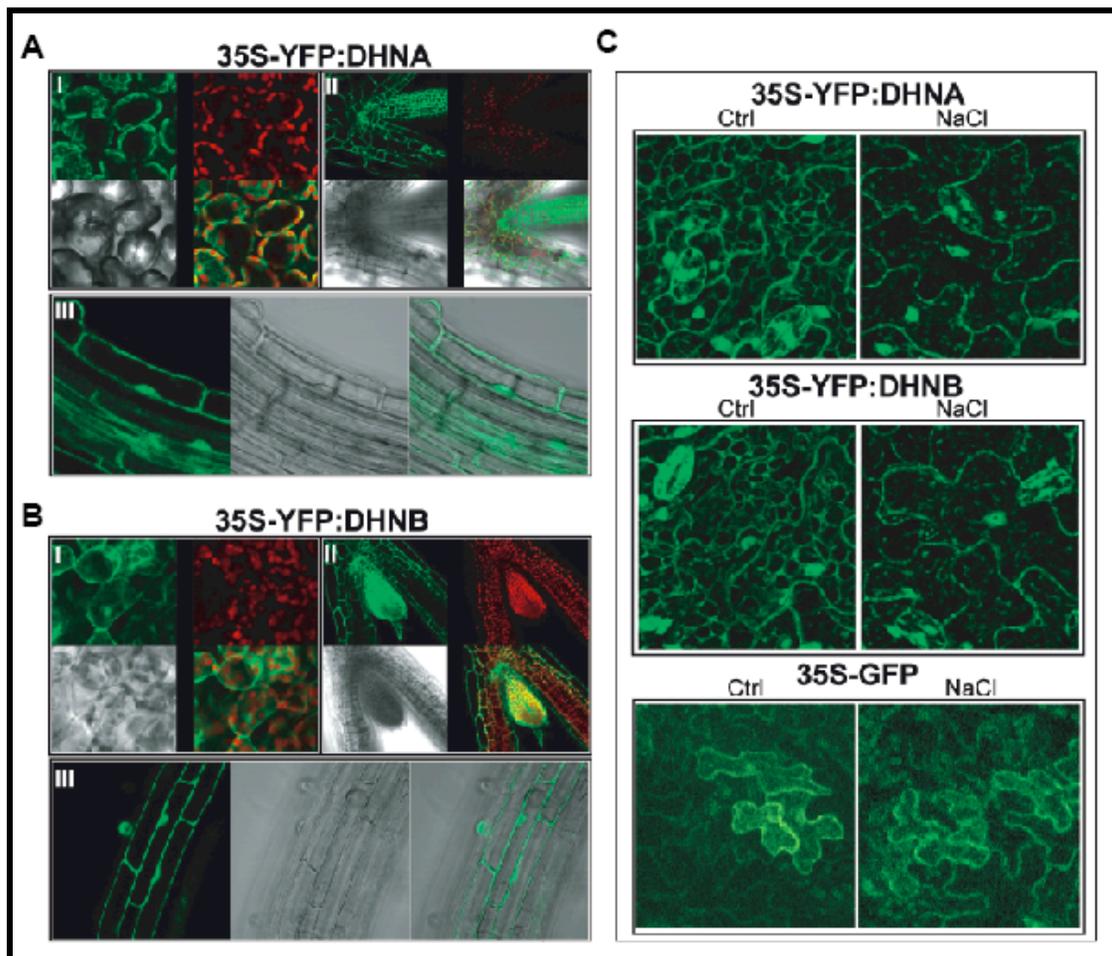


Figura 15: Localización subcelular de PpDHNA y PpDHNB. (B y C) Localización subcelular de PpDHNA (B) y PpDHNB (C) en líneas transgénicas de *A.thaliana* que sobreexpresan las fusiones 35S:YFP:PpDHNA y 35S:YFP:PpDHNB. (I) Imágenes de hojas, (II) cotilédones y punta de raíces, (III) Imágenes de raíces. En verde: emisión de YFP, en rojo: fluorescencia de los cloroplastos, en gris: luz transmitida del microscopio. (D y E) Cambios subcelulares de PpDHNA (D) y PpDHNB (E) en medio suplementado con 100mM de NaCl, comparado con condiciones normales (Ctrl)

Como resultado de la visualización de estas líneas en condiciones normales de crecimiento, se pudo observar que ambas líneas que sobreexpresan tanto PpDHNA como PpDHNB (fig. 15A y B, respectivamente) mostraron a la proteína YFP tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células, sugiriendo que estas DHNs tienen ambas localizaciones en plantas superiores. Sin embargo, la localización nuclear de estas proteínas debe confirmarse, debido a que la fluorescencia observada en este organelo puede ser debida a la proteína YFP no fusionada.

Por otro lado, para determinar si las condiciones de estrés condicionan la distribución subcelular de estas DHNs de *P.patens* en *A.thaliana*, se comparó el patrón de distribución de YFP en la epidermis de plantas controles sin tratar con plantas tratadas durante 24 horas con 100mM de NaCl. Como control se utilizaron plantas de *A.thaliana* que sobreexpresan constitutivamente la proteína GFP sin fusionar. Mientras que en condiciones normales la fluorescencia de YFP fusionada fue visible en el citoplasma, luego de los tratamientos con sal, la señal fue más débil en este compartimento, desplazándose hacia las membranas de las células (fig. 15C). Por otro lado, no se vieron diferencias en la distribución de GFP en las plantas que sobreexpresan esta proteína sin fusionar, tanto en las plantas controles como tratadas con estrés salino. Estos datos sugieren que ambas DHNs se encuentran localizadas en el citoplasma, mientras que en condiciones de estrés estas proteínas se acumulan en las cercanías de las membranas.

Para poder determinar la localización de PpDHNA en *P.patens*, se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-PpDHNA generados en el Laboratorio (Saavedra et al., 2006). Para ello se detectó la inmunofluorescencia indirecta de PpDHNA en secciones de material vegetal de *P.patens* embebido en resina correspondiente a gametofitos controles y tratados con ABA (fig. 16). Como control negativo se utilizaron preparados sin el agregado del anticuerpo primario. Todas las secciones se incubaron con Calcofluor White, el cual tiñe celulosa de la pared celular. El resultado obtenido fue consistente con la localización citosólica de PpDHNA en las células vegetales tratadas con ABA. En estas condiciones, PpDHNA se vio particularmente en las cercanías de la membrana plasmática, mientras que en las muestras controles sin tratar la señal fue más débil.

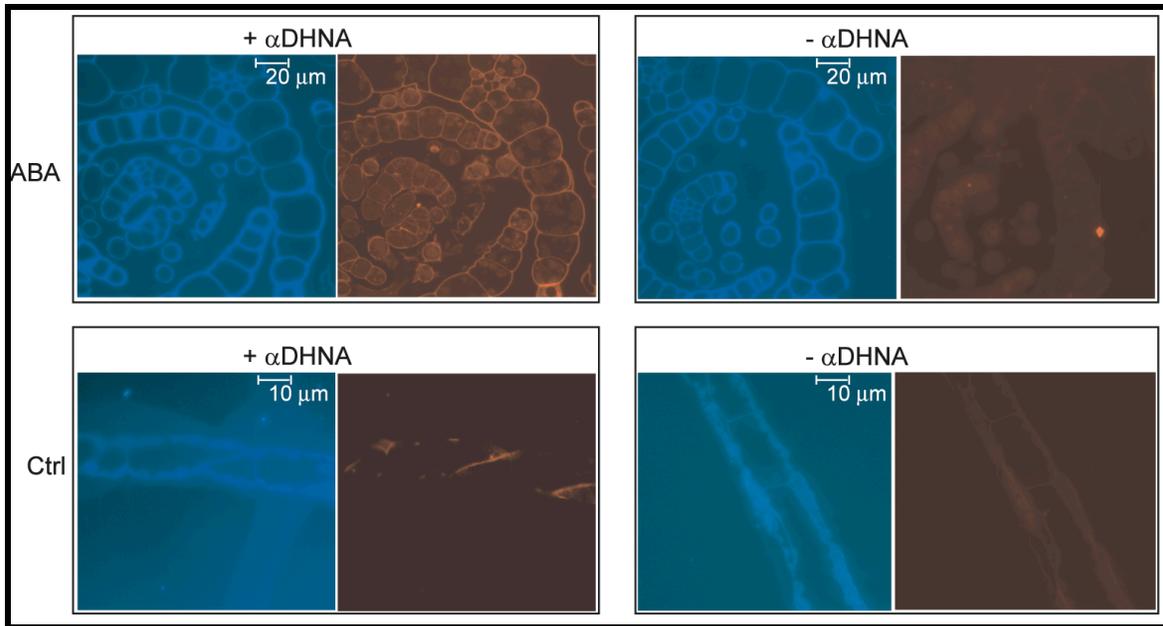


Figura 16: Localización subcelular de PpDHNA en *P.patens*. Inmunofluorescencia indirecta de gametóforos fijados en resina utilizando anticuerpos anti-PpDHNA. Colonias de *P.patens* fueron incubadas con el anticuerpo primario (+ α -PpDHNA) o sin anticuerpo primario (- α -PpDHNA). En los paneles de la derecha se muestra en rojo la fluorescencia del anticuerpo secundario. Los paneles de la izquierda corresponden a los mismos preparados teñidos con Calcofluor White. Ctrl: plantas crecidas en condiciones normales. ABA: plantas incubadas durante 24 horas con 50 μ M de ABA.

Como se mencionó anteriormente, tanto las proteínas YFP o GFP sin fusionar tienen una localización citosólica y nuclear, por lo que cuando se realizan fusiones con estos marcadores fluorescentes, si la proteína fusionada no posee un péptido señal que dirija esta fusión hacia un compartimento específico, es decir, si tiene una localización citosólica, parte de la señal también puede visualizarse en el núcleo. Esto es debido a que existen clivajes en la fusión, liberando YFP o GFP, dirigiéndose esta proteína hacia el núcleo. Por esta razón, es que cuando se realizó la sobreexpresión en plantas de *A.thaliana* se pudo observar que ambas líneas que sobreexpresan tanto PpDHNA como PpDHNB (fig. 15C) mostraron a la proteína YFP tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Para poder confirmar si la localización nuclear se debe al clivaje de YFP o a PpDHNA, se utilizaron plantas de *P.patens* que sobreexpresan esta proteína sin fusionar. Para ello se realizó una construcción génica que contiene la secuencia génica de *PpDHNA* en un vector con un promotor constitutivo, ubiquitina. La secuencia génica de *PpDHNA*, por otro lado, se encuentra flanqueada por dos secuencias genómicas homólogas a secuencias presentes en el locus 108 del genoma de *P.patens*, en las cuales será recombinada esta construcción, y donde esta estudiado no afecta la expresión de ningún otro gen. Se transformaron plantas de *P.patens* con dicha construcción, y las líneas generadas fueron analizadas molecularmente mediante de manera de confirmar la sobreexpresión de PpDHNA. Para ellos se realizaron ensayos de Western blot (mediante el uso del anticuerpo específico anti-PpDHNA) y de Northern blot, en plantas controles (datos no mostrados).

Se generaron protoplastos de esta línea y del genotipo salvaje mediante digestión con driselasa, y estos fueron fijados en un portaobjetos de manera de poder realizar ensayos

de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo primario específico anti-PpDHNA y un anticuerpo secundario Alexa 488.

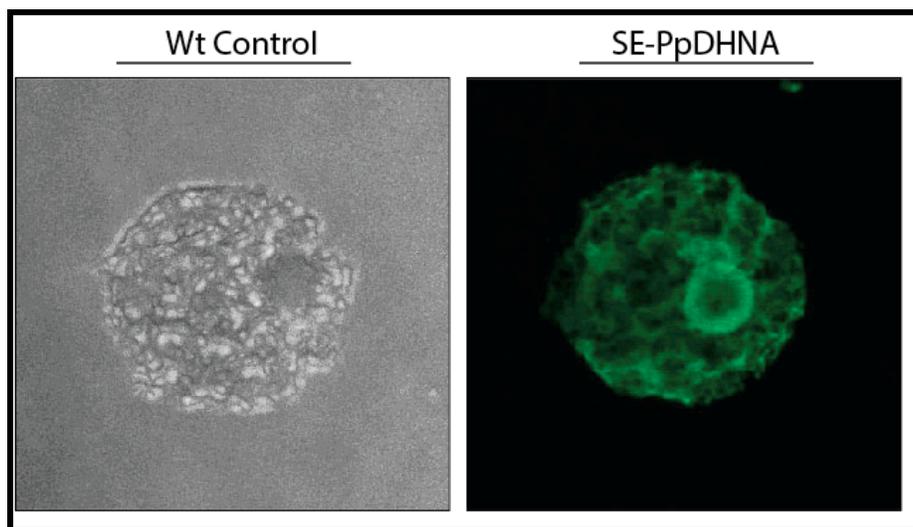


Figura 17: Inmunohistoquímica de protoplastos "fantasmas" de plantas de *P.patens* salvajes y que sobreexpresan PpDHNA. Se generaron líneas de *P.patens* que sobreexpresan la proteína PpDHNA de manera constitutiva. Estas plantas junto con el genotipo salvaje fueron utilizadas para la generación de protoplastos, los cuales fueron fijados en un portaobjetos previamente tratado con Vectabond mediante 3% paraformaldehído. Para la inmuno se utilizaron los anticuerpos anti-PpDHNA y un anticuerpo secundario marcado con Alexa 488.

Los preparados fueron visualizados en un microscopio confocal, confirmando que PpDHNA tiene no solamente una localización citosólica, como se había concluido observando las plantas de *A.thaliana* que sobreexpresan la fusión PpDHNA:YFP, sino que esta proteína también se dirige hacia el núcleo de las células (fig. 17). Queda por confirmar si esto también sucede con PpDHNB, aunque para ello se requiere de un anticuerpo específico anti-PpDHNB, el cual no disponemos actualmente.

Discusión

Para conocer mejor el rol que cumplen las dehidrasas en plantas, en este trabajo se analizaron las características estructurales de esta familia de proteínas en *P.patens*. En esta planta existen por lo menos 6 genes que codifican para estas proteínas, dos de las cuales se clasifican como "DHNS-like", por poseer segmentos K menos conservados. Las secuencias deducidas de los genes que codifican para PpDHNA, PpDHNB, PpDHNC y PpDHND contienen segmentos K en el extremo C-terminal, y corresponden a proteínas hidrofílicas e intrínsecamente desordenadas. Además, estas proteínas son ricas en glicinas y carecen de residuos de cisteína. Se analizó el patrón de expresión de *PpDHNA* y *PpDHNB*, los cuales fueron similares a otras DHNs de plantas superiores, acumulándose sus transcritos luego de tratamientos con ABA, y condiciones de estrés osmótico y salino. Por otro lado, *PpDHNB* también se vio inducida luego de tratamientos con bajas temperaturas.

En un trabajo anterior de nuestro grupo (Saavedra et al., 2006), se demostró que *PpDHNA* es fundamental para la recuperación de *P.patens* del estrés osmótico y salino (Saavedra et

al., 2006). Aquí demostramos la contribución de *PpDHNB* en la tolerancia al estrés mediante la generación y caracterización de líneas mutantes *knockout* para este gen, y la comparación de estas plantas con los mutantes para *PpDHNA* previamente generadas fue de un fenotipo similar pero con una menor contribución al proceso de recuperación del estrés. Ambos mutantes mostraron niveles mayores de daño celular a los del genotipo salvaje en respuesta a los tratamientos de estrés moderados, pero sólo *dhnA* exhibió una diferencia significativa luego de tratamientos con estrés severo. Esto sugiere que ambos genes juegan un rol importante en la tolerancia al estrés salino y osmótico en *P.patens*, aunque *PpDHNA* es más efectiva en proteger las células del daño generado por el estrés. Para poder determinar el rol que cumplen estas proteínas en la tolerancia al estrés salino y osmótico en plantas superiores, se generaron líneas de *A.thaliana* que sobreexpresan tanto *PpDHNA* como *PpDHNB*. Los resultados de los análisis fenotípicos de estas plantas mostraron que la sobreexpresión de *PpDHNA* tiene un efecto superior en la tolerancia a estos tipos de estrés, observándose una mayor tasa de crecimiento de las raíces y partes aéreas de las plantas transgénicas comparadas con las salvajes. Por otro lado, la sobreexpresión de *PpDHNB* resultó en una menor pero significativa tolerancia de estas líneas al estrés osmótico y salino.

En angiospermas hay resultados contradictorios acerca de la capacidad protectora de las diferentes dehidrinas. Algunos reportes describen que la sobreexpresión de DHN individuales (Brini et al., 2007; Xu et al., 1996; Sivamani et al., 2000) o de la combinación de diferentes DHNs (Puhakainen et al., 2004) aumenta la tolerancia al estrés, mientras que otros han fallado en demostrar una correlación entre el aumento de la expresión de este tipo de proteínas con la tolerancia al estrés (Iturriaga et al., 1992; Lang y Palva 1993; Kaye et al., 1998). En este trabajo se demostró claramente que una sola DHN de *P.patens* es capaz de conferir tolerancia al estrés osmótico y salino en *A.thaliana*. Además, se pudo demostrar que *PpDHNA* y *PpDHNB* contribuyen de manera diferente a la tolerancia al estrés. Tanto la pérdida de función en *P.patens* como la sobreexpresión en *A.thaliana* de *PpDHNA* tienen un impacto mayor en la tolerancia al estrés en estas plantas que cuando se realizan estos ensayos con *PpDHNB*.

Se ha demostrado que este tipo de proteínas intrínsecamente desordenadas presenta cambios conformacionales, adoptando una conformación de alfa-hélice anfipáticas cuando se encuentran en condiciones de baja hidratación, debido a la presencia de los segmentos K conservados en sus secuencias (Svensson et al., 2002; Saavedra et al., 2006). Estas alfa-hélices anfipáticas pueden interactuar con superficies de proteínas parcialmente hidratadas y con superficies de membranas (Koag et al., 2003), las cuales tienen funciones protectoras, como por ejemplo hacia la agregación térmica de otras proteínas (Kovacs et al., 2008). Se ha sugerido que algunas DHNs interactúan con la membrana plasmática de manera que previenen la desestabilización de la misma durante condiciones de deshidratación (Danyluk et al., 1998), interactuando específicamente con vesículas lipídicas presentes en las mismas (Soulages et al., 2002, 2003; Koag et al., 2003; Tolleter et al., 2007; Kovacs et al., 2008). Además, se ha demostrado recientemente que la DHN Lt30 de *A.thaliana* se une a membranas mediante la fosforilación de esta proteína y de

manera dependiente del pH (Eriksson et al., 2011). Existen varios estudios que reportaron la acumulación o relocalización de dehidrinas también en las cercanías de la membrana plasmática durante el estrés (Koag et al., 2003; 2009; Puhakainen et al., 2004; Santoni et al., 1998; Kawamura y Uemura 2002; 2003). Análisis de dos dehidrinas de *A.thaliana*, ERD10 y ERD14, mostraron que estas proteínas se unen a estructuras membranosas, y que esta unión se encuentra influenciada por fuerza iónica (Kovacs et al., 2008).

Los estudios de localización intracelular en *A.thaliana* realizados en este trabajo, sugieren que tanto PpDHNA como PpDHNB tienen una localización similar, la cual es citosólica y posiblemente nuclear. La localización nuclear de PpDHNA pudo ser confirmada mediante ensayos de inmunohistoquímica realizados en protoplastos de plantas transgénicas que sobreexpresan PpDHNA, pero aún no se pudo confirmar para PpDHNB. Además, nuestros resultados muestran que durante condiciones de estrés, estas proteínas se relocalizan parcialmente en las cercanías de las membranas. Consistente con estos resultados, se pudo ver mediante análisis de inmunohistoquímica que la proteína endógena PpDHNA en *P.patens* también se observa cerca de la membrana plasmática luego de tratamientos con ABA. Estas observaciones se suman al hecho de que los mutantes *knockout* de ambas dehidrinas en *P.patens* tienen mayor daño a nivel de membrana bajo condiciones de estrés, afirmando el hecho de que estas proteínas estarían protegiendo la membrana del daño causado.

La desnaturalización de proteínas es el fenómeno fisiológico más común que ocurre en las células vegetales expuestas a diferentes condiciones de estrés. De manera que para que la planta pueda sobrevivir a estas condiciones, la desnaturalización proteica debe prevenirse o debe reconstituirse de alguna manera. Se ha descrito que las dehidrinas podrían actuar como moléculas chaperonas, de manera de prevenir la desnaturalización de otras proteínas, muchas de las cuales tendrían actividad crioprotectora (Hara et al., 2001; Kazuoka y Oeda 1994; Houde et al., 1995; Rinne et al., 1999; Bravo et al., 2003; Reyes et al., 2005; 2008; Wisniewski et al., 1999; Tantos et al., 2009). Considerando que las bajas temperaturas es la condición donde se expresan mayoritariamente estas proteínas, se podría considerar que la crioprotección es una función crucial para las DHNs. Por otro lado, también se ha demostrado *in vitro* que las dehidrinas actúan como chaperonas. Un ejemplo de esto, es el de las DHNs ERD10 y ERD14, las cuales actúan previniendo la agregación por calor de varias enzimas (Kovacs et al., 2008). Sin embargo, el mecanismo por el cual se previene la desnaturalización de enzimas todavía permanece desconocido.

En este trabajo se pudo obtener evidencia de que una DHN de *P.patens* actuaría como proteína chaperona *in vitro*. Claramente pudimos demostrar que esta proteína protege otras enzimas, como es el caso de la lisozima, de agentes desnaturalizantes como el DTT o de exposiciones a altas temperaturas. La incubación de PpDHNA con lisozima hace que esta enzima no pierda su actividad luego de su desnaturalización en estas condiciones. Queda por determinar si PpDHNB posee también esta actividad *in vitro*, y compararla con otras dehidrinas de *A.thaliana*, como por ejemplo Lti29 y Lti30. Estas proteínas recombinantes ya se encuentran disponibles para estos análisis.

En base a estos resultados, también se realizaron ensayos fenotípicos en el mutante *dhnA* de *P.patens* con DTT. Aunque no se vieron diferencias durante tratamientos prolongados con este agente desnaturalizante, el mutante *dhnA* fue incapaz de recuperarse luego de 10 días de estrés, sugiriendo que esta proteína es importante para la estabilización *in vivo* de otras proteínas durante el estrés. Por otro lado, los tratamientos con calor no fueron efectivos en la recuperación de la planta, recuperándose de forma normal ambos genotipos. Cabe destacar que esta condición no induce la acumulación del transcripto *PpDHNA* (datos no mostrados).

Por último, uno de los objetivos principales cuando comenzamos con el estudio de estas proteínas en *P.patens*, era la generación de múltiples mutantes en las diferentes dehidrininas presentes en el genoma. El método de transformación de *P.patens* se basa en la digestión de material vegetal con enzimas que degradan la pared, de manera de obtener células protoplásticas para así poder transfectar el ADN deseado dentro de las mismas y ser integrado en el genoma. Pero esta transformación no fue posible, debido a que las enzimas utilizadas no pudieron degradar la pared celular del mutante *dhnA*, utilizado como genotipo background para la generación del doble mutante. Este hecho nos llevó a pensar que este mutante tenía alguna modificación importante en la composición de la pared. En primer lugar, observamos que normalmente esta planta acumula en su pared mayor cantidad de calosa. La calosa es un polímero amorfo y de gran tamaño molecular, formado por β -(1,3)-glucanos, y es un componente especializado de la pared celular o de estructuras asociadas a la pared importantes en algunos estadios del crecimiento o diferenciación celular (Stone y Clarke 1992). La calosa es un componente estructural de múltiples estadios del desarrollo del polen (Stone y Clarke 1992; McCormick 1993), y además, puede depositarse en los plasmodesmas, regulando el movimiento de moléculas entre célula-célula (Iglesias et al., 2000; Bucher et al., 2001). Este compuesto sirve como matriz donde los compuestos antimicrobianos son depositados, generando defensas químicas localizadas en el sitio de ataque en la célula, y su deposición puede ser inducida por heridas, infección de patógenos, ABA y otros estreses fisiológicos (Stone y Clarke 1992). La calosa es sintetizada por una clase de enzimas denominadas calosa sintetasas y en *A.thaliana* se han identificado 12 genes que codifican para este tipo de proteínas (Verma y Hong 2001; Richmond y Somerville 2000). Se han adoptado dos tipos de nomenclatura diferente para estos tipos de genes, el grupo de Verma y colaboradores las denominó CalS, mientras que el grupo de Somerville las denominó GSL (Glucan synthase-like). La calosa juega roles importantes en varios aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta. Además, la calosa se deposita en la membrana plasmática y en la pared celular como respuesta a heridas causadas por el estrés. Esta deposición puede ocurrir en cuestión de minutos luego de un daño mecánico, luego de tratamientos químicos o respuesta al estrés abiótico o biótico inducidos por plasmólisis, altas o bajas temperaturas o luego de infecciones microbianas (Stone y Clarke 1992). La mayor acumulación de calosa en el mutante *dhnA*, con respecto al genotipo salvaje, nos indica en primer lugar, que *PpDHNA* cumple una función en condiciones óptimas de crecimiento. Los estudios de expresión génica de *PpDHNA* han permitido dilucidar una muy leve

acumulación del transcripto y de su proteína en condiciones control, lo cual estaría apoyando esta idea. Varios estudios han demostrado que la acumulación de especies reactivas del oxígeno puede desencadenar el aumento en la deposición de calosa en la pared celular (Benitez-Alfonso et al 2009). Se ha propuesto que ambientes celulares oxidativos inducen la síntesis de calosa mediante calosa sintetas, Varios procesos del desarrollo o desencadenados en respuesta al estrés sugieren una co-regulación de la homeostasis de ROS y la deposición de calosa (Bolwell et al., 2002; Bussotti et al., 2005; Benitez-Alfonso et al., 2011). Por ejemplo, la exposición de las plantas a un estrés ambiental, como a metales pesados (tales como Al, Cd, entre otros), induce la producción de ROS junto con la acumulación de calosa (Sivaguru et al., 2000; Ueki and Citovsky, 2001; Yamamoto et al., 2002; Jones et al., 2006). Resultados preliminares, no mostrados, muestran que el mutante *dhnA* tiene aproximadamente 5 veces mayor concentración de H₂O₂ que el genotipo salvaje en condiciones óptimas de crecimiento, lo cual podría explicar los niveles altos de calosa en sus paredes celulares y por ende la mayor resistencia a la infección por ciertos patógenos, así como la menor susceptibilidad a la digestión de la pared por enzimas hidrolíticas. Estos resultados deberán corroborarse en estudios posteriores, así como la evaluación de las bases moleculares que determinan que el mutante tenga mayor contenido de ROS intracelular.

2- Caracterización funcional de *PpHsp16.4* de *P.patens*

Con el fin de detectar genes involucrados en la tolerancia al estrés abiótico en *P.patens* nuestro grupo generó previamente una biblioteca de cDNA enriquecida en secuencias inducidas por ABA en esta planta. Uno de los genes identificados fue un gen que codifica para una proteína de heat shock pequeña (sHSP) de 16.4 kDa, denominada *PpHsp16.4* (GenBank: XP_001757324.1). Esta proteína se encuentra codificada por dos genes nucleares idénticos, denominados *PpHsp16.4a* (Phypa_428883) y *PpHsp16.4b* (Phypa_428984), los cuales tienen una identidad del 100% y se encuentran en orientación opuesta en la misma región del genoma, separados por 7725 pb. Utilizando el dominio conservado alfa-cristalino que presentan todas las sHps, se realizó una búsqueda en el genoma de *P.patens* pudiéndose determinar la existencia de al menos 22 genes que codifican para sHSPs en esta planta. En la tabla 1 se muestra una lista de los genes, su localización genómica y sus proteínas deducidas con sus predicciones de localización subcelular.

Protein	Transcript	Phypa_v1.6	Phypa_v1.1	Scaffold	O	ORF	MW_(kDa)	Loc
PpHsp21.5	Pp1s129_85V6.1	Phypa_444537	Phypa_216427	Scaffold 129:..572968...574083	+	190	21.5	nuc/cyto
PpHsp20.1	Pp1s20_253V6.1	Phypa_427505	Pp1s20_253V6.1	Scaffold 20:..1742974...1743985	+	180	20.1	cyto
PpHsp19.4	Pp1s350_28V6.1	Phypa_458371	Phypa_199029	Scaffold 350:..287956...288477	+	173	19.4	cyto
PpHsp19.2	Pp1s50_96V6.1	Phypa_74946	Phypa_74946	Scaffold 50:..1002205...1002857	+	169	19.2	cyto
PpHsp22.0	Pp1s194_15V6.1	Phypa_220338	Phypa_220338	Scaffold 194:..62465...63601	-	195	22.0	cyto
PpHsp22.5	Pp1s77_290V6.1	Phypa_438264	Phypa_38520	Scaffold 77:..1524105...1525479	+	203	22.5	chlo
PpHsp18.4b	Pp1s144_148V6.1	Phypa_446028	Phypa_138125	Scaffold 144:..1053435...1053920	+	161	18.4	cyto
PpHsp18.4a	Pp1s11_289V6.1	Phypa_425098	Phypa_114905	Scaffold 11:..2264806...2266292	+	161	18.4	cyto
PpHsp13.4	Pp1s182_60V6.1	Phypa_141732	Phypa_141732	Scaffold 182:..494077...494645	+	121	13.4	cyto
PpHsp12.5	Pp1s3_114V6.1	Phypa_64616	Phypa_64616	Scaffold 3:..718664...719270	-	111	12.5	nucl
PpHsp16.4b	Pp1s27_332V6.1	Phypa_428984	Phypa_70357	Scaffold 27:..2270773...2272356	-	147	16.4	cyto
PpHsp16.4a	Pp1s27_331V6.1	Phypa_428883	Phypa_205434	Scaffold 27:..2261849...2263432	+	147	16.4	cyto
PpHsp17.2c	Pp1s85_11V6.1	Phypa_439482	Phypa_213039	Scaffold 85:..60370...61284	-	154	17.2	cyto
PpHsp17.3b	Pp1s372_62V6.1	Phypa_459035	Phypa_199515	Scaffold 372: 273630 - 274513	+	154	17.3	cyto
PpHsp17.8	Pp1s380_17V6.1	Phypa_459300	Phypa_37582	Scaffold 380:..166713...167180	+	155	17.8	cyto
PpHsp17.6	Pp1s105_133V6.1	Phypa_442034	Phypa_133671	Scaffold 105:..890756...891525	+	156	17.6	cyto
PpHsp17.3a	Pp1s8_86V6.1	Phypa_424252	Phypa_174654	Scaffold 8: 747337 - 748527	+	155	17.3	chlo
PpHsp17.2b	Pp1s8_249V6.1	Phypa_424267	Phypa_158998	Scaffold 8:..2505191...2506195	-	153	17.2	chlo
PpHsp17.2d	Pp1s8_209V6.1	Phypa_424256	Phypa_65913	Scaffold 8:..2007522...2008526	+	153	17.2	chlo
PpHsp17.2a	Pp1s8_244V6.1	Phypa_424313	Phypa_113859	Scaffold 8:..2415925...2416902	+	153	17.2	chlo
PpHsp27.5	Pp1s97_106V6.1	Phypa_440946	Phypa_81689	Scaffold 97: 716468 - 718213	+	246	27.5	chlo
PpHsp27.3	Pp1s38_338V6.1	Phypa_72790	Phypa_72790	Scaffold 38: 1916174 - 1917189	+	242	27.3	mito

Tabla 1. Proteínas sHSP de *P.patens*. Se asignaron los nombres de las proteínas dependiendo del peso molecular (MW) en kilodaltons (kDa) de las proteínas deducidas. Se muestran los nombres de los transcritos y los números Phypas de la base de datos Phytozome de las versiones del genoma v1.1 y v1.6 de *P.patens*. Los valores de los Scaffolds representan la posición genómica de los genes. O: orientación; ORF: número de aminoácidos del marco de lectura abierto; Loc: localización subcelular deducida (nuc: nuclear; cyto: citosólica; chlo: cloroplástica).

Se estudió la relación filogenética que existe entre la familia de sHps de *P.patens*, *A.thaliana* y arroz, mediante ClustalW (Thompson et al., 1997), seguido de algoritmos de neighbor-joining mediante MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). Basado en homología en la secuencia aminoacídica, estos análisis demuestran que tanto *PpHsp16.4a* como *PpHsp16.4b* pertenecen a la clase II de sHsp (Figura 17).

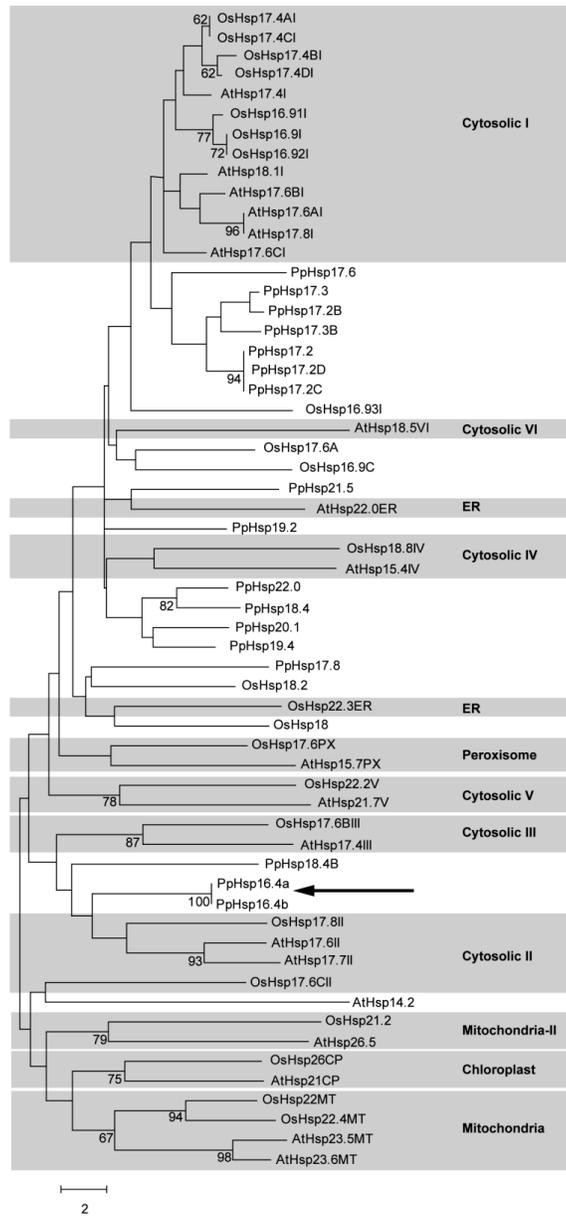


Figura 17: Análisis filogenético de las sHSPs deducidas de *A.thaliana* (At), arroz (Os) y *P.patens* (Pp). Las secuencias aminoacídicas completas fueron alineadas mediante CLUSTAL W y se construyó un árbol filogenético mediante el método de neighbor-joining utilizando MEGA versión 5. Los números en las ramificaciones representan 1000 replicas de bootstrap. Las sHSPs de *A.thaliana* y arroz están separadas en subclases diferentes y se encuentran marcadas en recuadros grises. ER: retículo endoplasmático. Las flechas muestran las sHSPs de *P.patens* PpHsp16.4a y PpHsp16.4b.

Se analizó el nivel de expresión de *PpHsp16.4* en respuesta a diferentes tipos de estrés o en respuesta a tratamientos con hormonas o compuestos químicos que producen estrés celular. Debido a que las regiones genómicas de *PpHsp16.4a* y *PpHsp16.4b* son 100% idénticas, incluyendo las primeras 700 pb de sus regiones promotoras, se espera que la expresión de ambos genes sea similar entre ellos. Para analizar su expresión, se aisló ARN de plantas controles y tratadas con las hormonas ABA y ácido salicílico (SA), compuestos

inductores de estrés oxidativo, como H₂O₂ y metil viológeno (MV), compuestos químicos causantes de la desnaturalización de proteínas como el DTT, y diferentes condiciones de estrés abiótico, como manitol (estrés osmótico), NaCl (salinidad), 37°C (estrés térmico), UVB o altas intensidades de luz (350µE). Todos los tratamientos fueron realizados durante 24 horas, con excepción de la exposición a altas intensidades de luz que se realizó durante 2 horas. Se analizaron los niveles de los transcritos de *PpHsp16.4* mediante Northern blot, utilizando como sonda la secuencia completa de cDNA del gen (Fig. 18A).

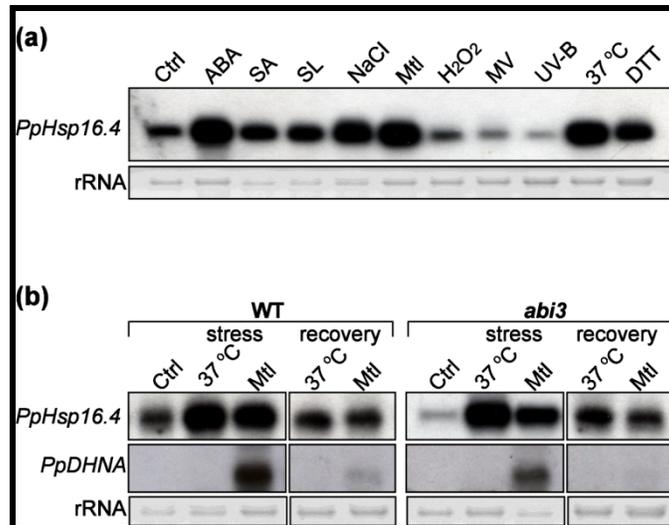


Figura 18: Patrón de expresión de *PpHsp16.4*. (A) Se extrajo ARN total de plantas salvajes controles (Ctrl), tratadas durante 24 horas con 50µM ABA, 1mM SA, 500mM Manitol (Mtl), 300mM NaCl, 10mM DTT, 100µM metil viológeno (MV) y 100µM H₂O₂, altas temperaturas (37°C), UVB y luego de 2 horas de exposición a altas intensidades de luz (350µE, SL). 10µg de ARN fue analizado mediante Northern blot utilizando como sonda de hibridación la secuencia completa del cDNA de *PpHsp16.4* marcada con [^α³²P]-dCTP. (B) Análisis por Northern blot de los transcritos de *PpHsp16.4* y *PpDHNA* en genotipo salvaje (wt) y *abi3*. Se extrajo ARN total de plantas controles (Ctrl), plantas expuestas a 37°C o incubadas en medio suplementado con 900mM de Manitol (Mtl). Las muestras fueron recolectadas luego de dos días de estrés y también luego de 6 horas de recuperación en medio normal. Se utilizó como sonda de hibridación las secuencias completas de los cDNAs de *PpHsp16.4* y *PpDHNA* marcadas con [^α³²P]-dCTP. Para todos los Northern blot el ARNr teñido con bromuro de etidio fue utilizado como control de carga de las muestras de ARN.

El hecho de que se haya detectado una sola banda de hibridación sugiere la ausencia de hibridación cruzada de la sonda de cDNA con ARNm homólogos. En el resultado del Northern blot se puede observar que *PpHsp16.4* además de tener una expresión basal constitutiva, se encuentra fuertemente inducido por los tratamientos con ABA, SA, DTT y luego de la exposición con altas temperaturas, altas intensidades de luz, estrés salino y osmótico. En contraste con ésto, no se vió aumento de la expresión de *PpHsp16.4* en respuesta a UVB o a compuestos inductores de estrés oxidativo, como H₂O₂ o MV. Este resultado fue inesperado, ya que la mayoría de los genes de sHSPs de tipo CI y CII de otras especies vegetales son inducidas por estrés oxidativo (Waters 2013).

Algunas sHSPs han sido vinculadas con la capacidad de recuperación del estrés térmico (Waters et al., 1996). Con ese antecedente, analizamos la expresión de *PpHsp16.4* luego de retirado el estrés por altas temperaturas o el estrés osmótico (fig. 18B). Para ello, se incubaron plantas durante 48 horas a 37°C o en placas con manitol, y luego fueron

transferidas a medio de crecimiento normal durante 6 horas. La expresión de *PpHsp16.4* fue comparada con la de la dehidrina *PpDHNA*, la cual se mostró previamente estar fuertemente inducida en estrés osmótico, y cuya expresión se ve fuertemente reducida en la etapa de recuperación del (Saavedra et al., 2006; Ruibal et al., 2012). Los resultados demuestran que, en contraste con *PpDHNA*, los niveles de expresión de *PpHsp16.4* siguen altos luego de que las plantas retornan a condiciones normales, sugiriendo que esta proteína podría jugar un rol importante también durante la recuperación del estrés.

Recientemente, Khandelwal y colaboradores (Khandelwal et al., 2010) demostraron que ABI3 es esencial para la recuperación de la deshidratación severa en *P.patens*. Los tratamientos con estrés en los mutantes *abi3* resultan en una pequeña o nula reducción de la expresión de varios genes asociados a la tolerancia al estrés. Sin embargo, la acumulación de los transcritos de varios de los genes ensayados estuvo drásticamente comprometida en los mutantes *abi3* durante la recuperación del estrés, sugiriendo que esta proteína es requerida en esta etapa. Estos resultados nos llevaron a investigar la relevancia biológica de ABI3 en la regulación de la expresión de *PpHsp16.4*. Para ello, se utilizó la línea mutante *abi3*, la cual está mutada en las tres copias del gen *abi3* (Khandelwal et al., 2010). Nuestros resultados mostraron que los niveles basales de los transcritos de *PpHsp16.4* en condiciones normales de crecimiento, se encuentran considerablemente disminuídos en *abi3* comparados con el genotipo salvaje. Sin embargo, el patrón de expresión de *PpHsp16.4* es similar en ambos genotipos, tanto durante el estrés como durante la recuperación del mismo. En contraste con esto, la acumulación de los transcritos de *PpDHNA* en respuesta al estrés osmótico se observó considerablemente reducida en los mutantes *abi3*, sugiriendo que existen diferentes vías que regulan la expresión de estos dos genes durante el estrés (fig. 18B). En conjunto, se puede concluir que la inducción de *PpHsp16.4* en respuesta al estrés en *P.patens* se encuentra regulada de manera independiente a ABI3, tanto durante el estrés como durante la recuperación del mismo.

a) Generación, caracterización molecular y fenotípica de mutantes *knockout* de *PpHsp16.4* en *P.patens*

Para poder estudiar la función de *PpHsp16.4* en la tolerancia al estrés, se realizó la disrupción génica de las dos copias del gen en *P.patens*. Debido a que *PpHsp16.4a* y *PpHsp16.4b* son idénticos a nivel nucleotídico, se utilizó una única construcción para el reemplazo de ambos genes mediante recombinación homóloga (fig. 19). En esta construcción, la mayoría de la secuencia del primer exón y del intrón de los genes fue reemplazada por el cassette de resistencia a kanamicina (*nptII*). La selección de los mutantes generados fue realizada mediante PCR, y por causa de la existencia de dos genes idénticos, se buscaron 3 tipos de mutantes, uno con el gen *PpHsp16.4a* interrumpido, otro con *PpHsp16.4b* y un doble mutante con ambos genes interrumpidos (fig. 19).

Para poder identificar eventos de inserción en *PpHsp16.4a*, se utilizó un primer reverso localizado dentro del cassette de selección (primer c) junto con un primer forward (primer

a) localizado por fuera de la construcción, dentro de la región genómica upstream de *PpHsp16.4a*, la cual no tiene homología de secuencia con la región genómica upstream del gen *PpHsp16.4b*. De manera similar, para la identificación de los eventos de inserción dentro de la secuencia génica de *PpHsp16.4b*, se utilizó un primer forward localizado en la secuencia del cassette de selección (primer c) y un primer reverso (primer e) que se une a la región genómica por fuera de la construcción, downstream del gen. Los tamaños esperados de los productos de PCR de estas reacciones son de 1353 pb y 1378 pb, para los eventos de reemplazo de los genes *PpHsp16.4a* y *PpHsp16.4b*, respectivamente.

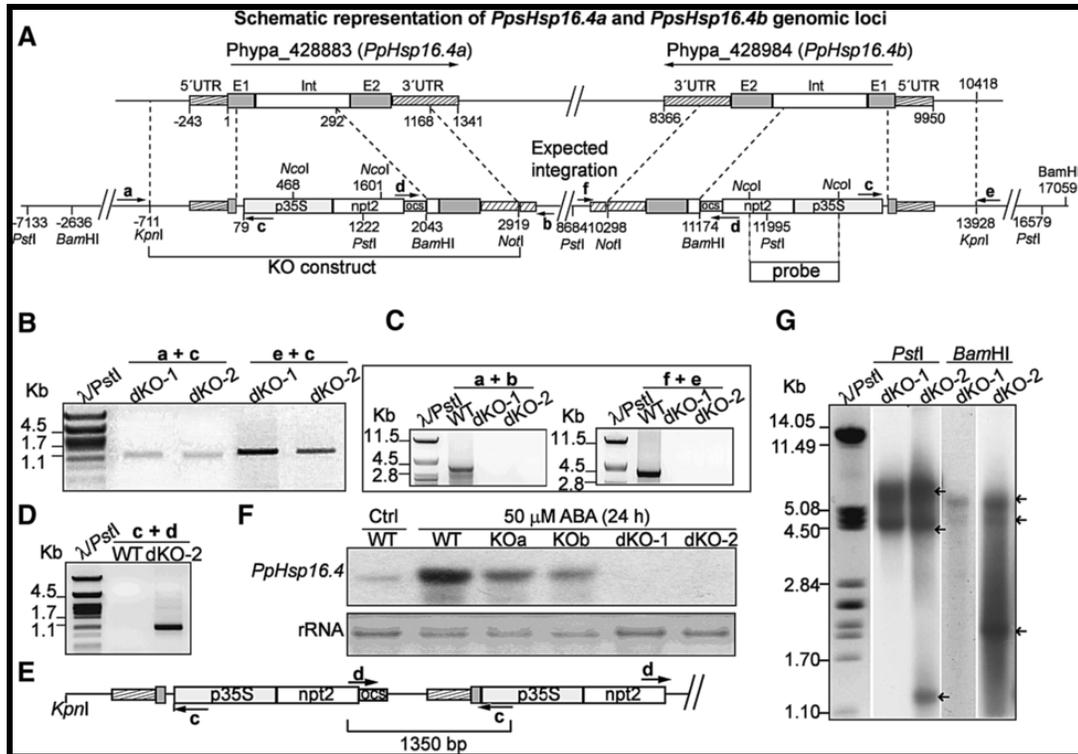


Figura 19: Generación del mutante *knockout* en el loci de *PpHsp16.4a* y *PpHsp16.4b*. (A) Estructura genómica de *PpHsp16.4a* y luego de la construcción. E1 y E2: intrones, Int: intrón. La posición de los primers utilizados para el análisis por PCR de las plantas salvajes (WT) y mutantes se indican con flechas. (B) Análisis por PCR de los dobles mutantes (dKO1 y dKO2), utilizando primers específicos en regiones del genoma diferentes para cada gen. (C) Amplificación por PCR de la secuencia genómica de *PpHsp16.4*, usando los primers a + b y f + e. (D) Detección de concatémeros utilizando los cebadores c + d. (E) Representación esquemática del ADN genómico obtenido por secuenciación del producto de PCR obtenido en (D). (F) Análisis por Northern blot de plantas WT y líneas *knockout* individuales (KOa, KOb), y el doble mutante; utilizando ARN total aislado de plantas tratadas con ABA 50μM durante 24 h o de plantas control (Ctrl). Como sonda se utilizó cDNA de la secuencia de *PpHsp16.4* marcado radiactivamente. (G) Análisis por Southern blot de plantas WT, dKO1 y dKO2. El ADN genómico se digirió con PstI y BamHI, y se hibridó con una sonda de ADN marcada radioactivamente y mostrada en (A). Las flechas indican las bandas de hibridación.

Se obtuvieron varias líneas donde tanto *PpHsp16.4a* como *PpHsp16.4b* fueron interrumpidos. De estas líneas se seleccionaron dos líneas independientes (dKO-1 y dKO-2) donde la recombinación homóloga ocurrió en el extremo 5' de ambos genes (fig. 19B). Para analizar si estas líneas incorporaron correctamente la construcción mediante recombinación homóloga, se diseñaron primers que reconocen secuencias específicas por fuera de la construcción, downstream a *PpHsp16.4a* (primer b) o a *PpHsp16.4b* (primer f).

Cuando se utilizaron estos primers con un primer localizado en el cassette de selección (primer d), no se observaron productos de PCR en ninguna de las líneas analizadas. Este resultado podría ser indicativo de un patrón de integración derivado de un evento de recombinación homóloga en un extremo y de recombinación ilegítima en el otro. Para determinar si alguna copia del locus salvaje permanece adyacente a la construcción insertada en el genoma, se utilizaron primers que reconocen secuencias genómicas flanqueando la construcción tanto de *PpHsp16.4a* (primers a y b) como de *PpHsp16.4b* (primers f y e). Se obtuvieron los tamaños de los productos de PCR esperados (3882 pb para *PpHsp16.4a* y 4024 pb para *PpHsp16.4b*) para el genotipo salvaje, pero no se obtuvieron bandas en los ADN genómicos de las líneas mutantes, indicando la ausencia de una copia entera salvaje en los dobles mutantes (fig. 19C).

Se ha observado que cuando se transforma *P.patens* con vectores de reemplazo, se generan patrones de integración complejos, derivados de concatenación del ADN o de otros posibles rearrreglos genómicos (Kamisugi et al., 2006). Para analizar la naturaleza de la integración del ADN en los loci de *PpHsp16.4a* y *PpHsp16.4b* en las líneas doblemente reemplazadas, se utilizaron dos primers específicos hacia fuera (c y d) que reconocen el cassette de selección, para así poder identificar posibles concatémeros cabeza-cola. En el resultado de este PCR se observó un único fragmento de 1,3 Kb en la línea dKO-2 (fig. 19D). Este fragmento fue clonado y secuenciado y el resultado apoya el modelo donde al menos dos copias de la construcción fue integrada en el ADN en orientación cabeza-cola, pero con la pérdida del extremo 3' de la secuencia genómica de *PpHsp16.4*. Por otro lado, cuando se utilizó un primer sólo para la reacción de PCR, no se observaron bandas de amplificación, lo cual indicaría la ausencia de concatémeros cabeza-cabeza o cola-cola. En la figura 19E se muestra una representación esquemática del posible patrón de integración tanto para el locus de *PpHsp16.4a* como de *PpHsp16.4b*.

Por último, se realizaron estudios de Southern blot, para determinar el número de copias de la construcción insertadas en el genoma (fig. 19G), y se utilizó como sonda parte del cassette de selección. Para ello, se digirió el ADN genómico de los dobles mutantes con las enzimas de restricción PstI o BamHI, las cuales cortan dentro del cassette de selección, en las posiciones mostradas en la figura 19A. Si ocurrió una inserción única en cada uno de los genes dirigidos, entonces cuatro bandas de hibridación de los siguientes tamaños serán detectadas luego de la digestión con PstI, 8.38, 4.58, 7.7 y 3.3 Kb, y dos bandas de 5.4 y 4.7 Kb luego de la digestión con BamHI. El patrón de restricción obtenido luego de la digestión con PstI resultó en dos bandas de 8.4 y 4.5 Kb en ambas líneas mutantes. Es posible que las bandas de 7.7 y 3.3 Kb no fueran detectadas debido a la corta área de cobertura de la sonda. En el caso de la línea dKO-2, se observó una banda de 1.5 Kb adicional, lo cual corrobora el modelo de múltiples eventos de integración en el mismo locus. En la digestión con BamHI, por otro lado, se observaron dos bandas de hibridación de 5.4 y 4.7 Kb en ambos mutantes, y se observó una banda adicional de 1 Kb en el mutante dKO-2. Estos resultados sugieren que no existen inserciones adicionales en otra región del genómico fuera de los loci de *PpHsp16.4a* y *PpHsp16.4b* en los doble mutantes,

aunque ocurrió, con al menos la línea dKO-2, un patrón de integración complejo, seguramente involucrando la delección de una parte del ADN entre los dos genes.

Para confirmar la pérdida de función del gen *PpHsp16.4* en las líneas mutantes, se analizó la acumulación del transcrito mediante Northern blot, luego de tratar las plantas salvajes y mutantes con ABA. En los mutantes simples (KOa y KOb) los niveles del transcrito *PpHsp16.4* fue menor que en las plantas salvajes, mientras que en las líneas dobles mutantes la expresión de estos genes fue completamente nula (fig. 19F).

PpHsp16.4 es necesaria para la recuperación del estrés térmico, osmótico y salino

Los análisis fenotípicos que se muestran corresponden únicamente a los resultados obtenidos con el mutante dKO-1 (fig. 20 y 21), ya que tanto dKO-1 como dKO-2 no difirieron fenotípicamente en ninguno de los experimentos realizados. No se observaron diferencias en la tasa de crecimiento o de desarrollo en condiciones normales (fig. 20A, ctrl). Para obtener datos funcionales del posible rol que cumple *PpHsp16.4* durante condiciones de estrés, se monitoreó tanto el crecimiento como el contenido de clorofila de la línea mutante y salvaje en varias condiciones de estrés, entre ellas estrés oxidativo con H₂O₂ y MV, sin poder obtener diferencias entre ambos genotipos.

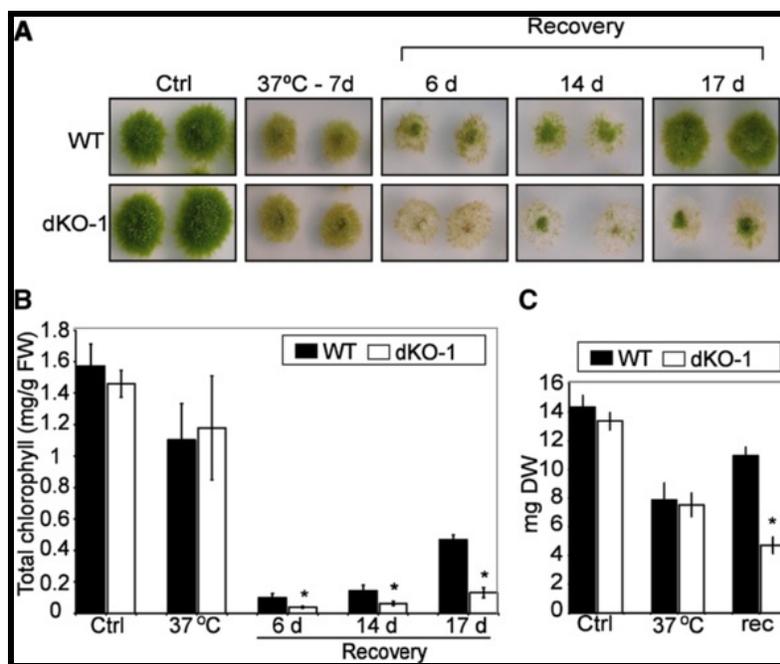


Figura 20: Efecto del estrés por altas temperaturas en *P.patens* salvajes y mutante. (A) Comparación fenotípica de plantas WT y dKO1 crecidas en condiciones normales (Ctrl) e incubadas durante 7 días a 37°C. Las colonias traspasadas a medio normal, y el proceso de recuperación fue fotografiado a los 6, 14 y 17 días. (B) La medida de contenido de clorofila total (mg/g/peso fresco) por colonia se determinó a partir de controles sin tratar (Ctrl), y plantas estresadas durante 7 días (37°C), en los puntos de tiempo indicados de recuperación en medio normal. (C) Medidas de peso seco por colonia (mg) control (Ct), estresadas (37°C) y plantas recuperadas en condiciones normales de crecimiento luego de 17 días (rec). Las barras de error indican SD (n=15). Se llevaron a cabo tres repeticiones biológicas. Las diferencias significativas de al menos 0,05 nivel de confianza entre las *knockout* y salvaje están marcados con un *.

Por otro lado, las líneas doble mutantes fueron incapaces de recuperarse a un estrés prolongado por calor (fig. 20) o a un estrés osmótico severo (manitol 900mM) o salino

(NaCl 500mM) (fig. 21A y B). Las plantas salvajes muestran una completa recuperación luego de 17 días de traspasadas a condiciones normales, mientras que las plantas mutantes no se recuperaron luego de transcurrido este tiempo. Bajo estas condiciones, tanto el contenido de clorofila como el peso seco de los dobles mutantes se redujeron en un 50% cuando se compararon con las plantas salvajes. Estos resultados mostraron que *PpHsp16.4* tiene un rol esencial en la recuperación de *P.patens* del estrés prolongado por calor y en condiciones de estrés salino y osmótico severo.

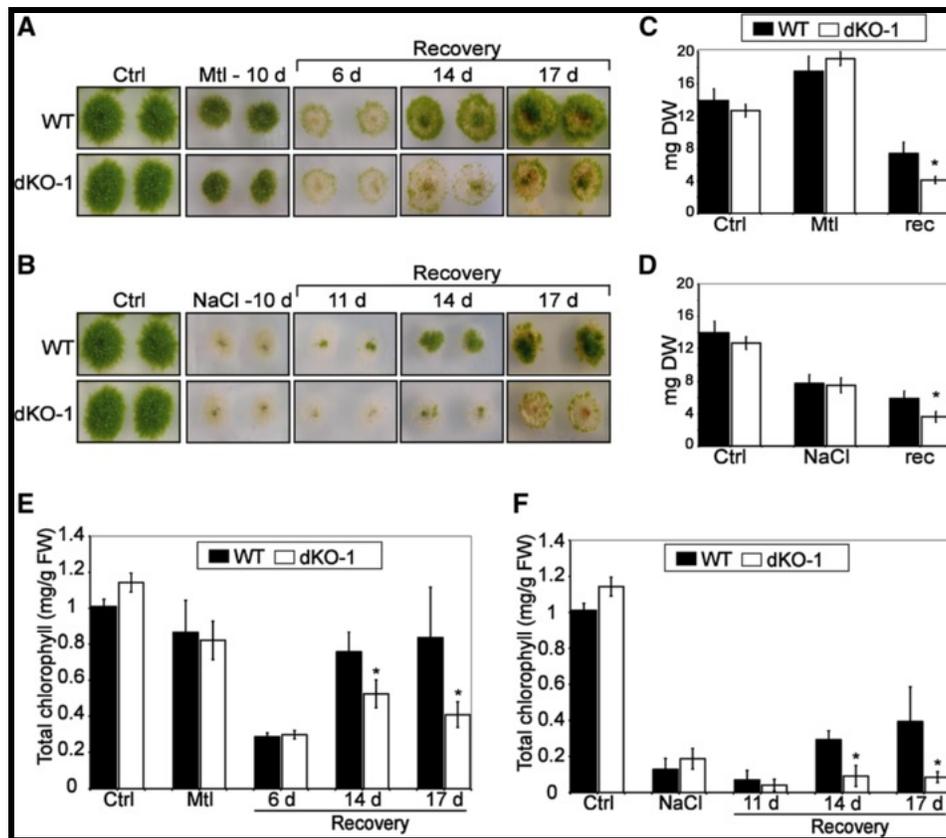


Figura 21: Efecto del estrés osmótico y salino en *P.patens* tipo salvaje y mutante *knockout*. (A) Imágenes de plantas salvajes y dKO1 crecidas en condiciones normales (Ctrl), incubadas durante 10 días en medio suplementado con manitol 900mM (Mtl-10d), y recuperadas durante 6, 14 y 17 días del estrés osmótico. (B) Igual que anterior pero empleando NaCl 500mM como factor de estrés y 11, 14 y 17 días de recuperación. (C) Medidas de peso seco por colonia en miligramos (mg) de plantas controles (Ct), plantas estresadas con manitol 900mM durante 10 días (Mtl) y plantas recuperadas del estrés durante 17 días (rec). (D) Igual que (C) pero utilizando 500mM de NaCl como factor de estrés. (E) Medidas del contenido total de clorofila (mg/g/peso fresco) por colonia de plantas controles (Ctrl), tratadas con manitol (Mtl) y recuperadas del estrés en los puntos de tiempo indicados en días. (F) Misma que anterior pero usando NaCl como factor de estrés. Las barras de error indican SD (n=15). Se llevaron a cabo tres réplicas biológicas. Las diferencias significativas de al menos 0,05 nivel de confianza entre los de tipo salvaje y las líneas mutantes son marcados por *.

b) *PpHsp16.4* se localiza en acúmulos citosólicos

Para determinar la localización intracelular de *PpHsp16.4*, se realizaron dos tipos de estrategias, por un lado se realizó una construcción génica donde se fusionó la región codificante de *PpHsp16.4* en marco con la secuencia codificante de la proteína fluorescente GFP, expresada bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S (35S:*PpHsp16.4*-GFP). Esta construcción fue transformada en plantas de tabaco mediante

agroinfiltración de sus hojas y también mediante transformación de protoplastos (fig. 22-II y III). Además, la misma construcción se utilizó para transformar establemente plantas de *A.thaliana*, las cuales podrán ser utilizadas en un futuro para evaluar el efecto de la sobreexpresión de esta proteína en una planta vascular (fig. 22-IV y V). Las hojas y las raíces de estas plantas transgénicas fueron visualizadas en un microscopio confocal. Como control para la expresión transitoria en tabaco, se utilizó una construcción que expresa GFP de manera constitutiva (fig. 22-I).

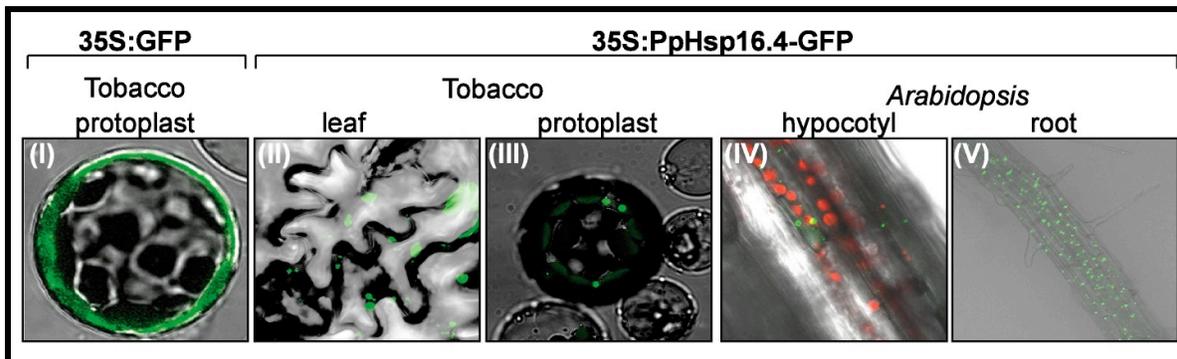


Figura 22: Localización subcelular de PpHsp16.4 en *A.thaliana* y tabaco. Imágenes de microscopio confocal de: protoplastos de tabaco electroporados con la construcción 35S:GFP (I) o con la construcción 35S:PpHsp16.4-GFP (II); hojas de tabaco agroinfiltradas con la construcción 35S:PpHsp16.4-GFP (III); líneas de *A.thaliana* estables que sobreexpresan la proteína de fusión PpHsp16.4-GFP (IV y V).

Los resultados de microscopia confocal mostraron que, mientras que la señal de GFP no fusionada se encuentra distribuida homogéneamente en el citosol de los protoplastos de tabaco, la proteína de fusión PpHsp16.4-GFP se observó tanto en las hojas de tabaco agroinfiltradas como en los protoplastos transfectados o en las líneas de *A.thaliana* transgénicas, en cuerpos redondeados de diferentes tamaños (fig. 22A-II a V). La heterogeneidad en el tamaño y el número de estructuras fluorescentes, sugieren que PpHsp16.4 forma largas estructuras moleculares en el citosol de las células vegetales.

Para evaluar si el patrón de localización subcelular observado no fue un artefacto debido a la utilización de un promotor fuerte y constitutivo en un sistema heterólogo, generamos líneas de *P.patens* (*knock-in*) que expresan una fusión de PpHsp16.4 con una proteína fluorescente (Citrina), bajo la regulación de su propio promotor y en el contexto natural de expresión de este gen. Las líneas *knock-in* fueron producidas mediante la inserción, por recombinación homóloga, del gen que codifica para la proteína amarilla fluorescente Citrina (Heikal et al., 2000), inmediatamente antes del codón de terminación de *PpHsp16.4* (fig. 22B). Como resultado, la expresión del gen quimérico *PpHsp16.4-Citrina* está controlado por el promotor endógeno del mismo gen.

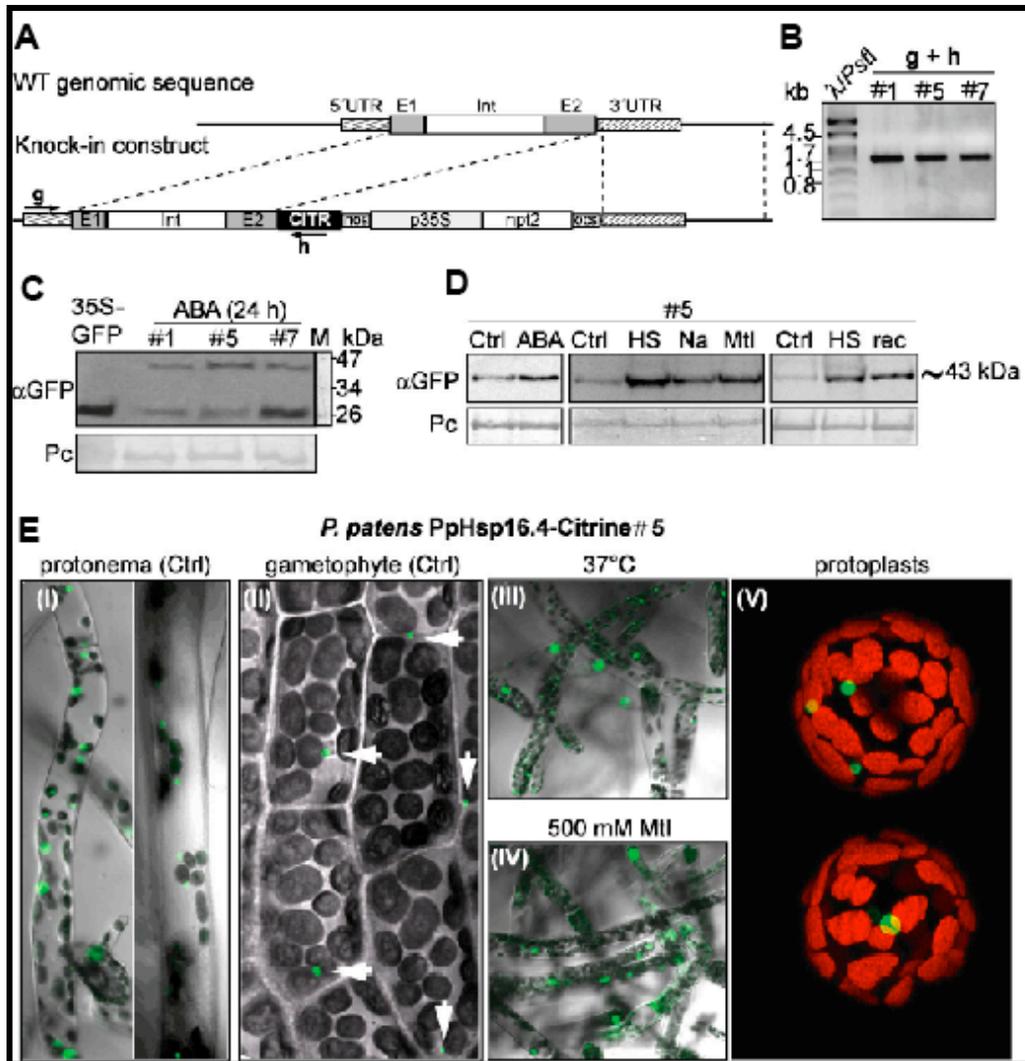


Figura 23: Localización subcelular de PpHsp16.4 en *P. patens*. (A) Representación esquemática del locus PpHsp16.4 y de la construcción knock-in en *P. patens*. E1 y E2: exones; Int: intrón; CITR: secuencia codificante para la Citrina; UTR: extremos 5' y 3' no traducidas. La posición de los primers utilizados para el análisis de PCR se indican con flechas. (B) Análisis por PCR de las líneas transgénicas (#1, #5 y #7), utilizando los primers g + h marcados en (A). (C) Detección por Western blot de la proteína de fusión PpHSP16.4:Citrina. Las proteínas de las líneas #1, #5 y #7 fueron extraídas de plantas tratadas durante 24 horas con 50 μ M de ABA, y analizadas por Western blot utilizando anticuerpos anti-GFP. Como control se utilizó una muestra de proteína de *A.thaliana* que expresa GFP (35S:GFP). (D) Se prepararon muestras de controles (Ctrl) o de plantas tratadas con 50 μ M de ABA o incubadas con NaCl 300mM (Na) o manitol 500mM (Mtl), o a 37°C (HS). Panel de la derecha, las plantas se incubaron durante 48 horas a 37°C (HS) y se recuperaron durante 6 horas (Rec). (E) Regulación espacial y localización subcelular de proteínas de fusión de la línea PpHsp16.4:Citrina #5. Imágenes de microscopía confocal de protonema sin tratar (I), gametofito de hoja (II), protonema expuesto durante 24 horas a 37°C (III), protonema incubado en 500 mM de manitol (IV) y protoplastos (V). Las flechas blancas indican la fluorescencia correspondiente a la proteína citrina. Imagen verde: GFP o emisión de Citrina, en rojo: fluorescencia de cloroplastos, en gris: microscopía óptica de transmisión.

La caracterización molecular de estas líneas se basó en primer lugar en confirmar mediante PCR el gen de fusión en estas líneas transgénicas, utilizando primers específicos que reconocen por un lado secuencias en el gen *Citrina* dentro de la construcción de reemplazo y por otro secuencias genómicas que flanquean la región 5' de ambos genes idénticos *PpHsp16.4a* y *PpHsp16.4b* (fig. 23A). En base a los productos de PCR obtenidos (fragmentos de 1787 pb) se seleccionaron tres líneas que integraron correctamente la construcción en el locus de *PpHsp16.4*. Por otro lado, también se realizaron análisis por

Western blot con muestras de proteínas de estas plantas tratadas con ABA, y utilizando anticuerpos comerciales anti-GFP, de manera de observar la proteína de fusión de aproximadamente 43 kDa, tamaño consistente con la proteína de fusión predicha (fig. 23C). En estos análisis, también se detectó una banda adicional de menor masa molecular, 27 kDa, la cual corresponde al clivaje de la proteína Citrina. Para confirmar si el patrón de acumulación de la proteína de fusión PpHsp16.4-Citrina corresponde con el patrón de expresión del gen *PpHsp16.4*, las líneas transgénicas *knock-in* fueron analizadas por Western blot luego de tratamientos con ABA o en respuesta a otras condiciones de estrés abiótico, como altas temperaturas (37°C), sal (NaCl) o estrés osmótico (manitol). La acumulación de la proteína de fusión también fue analizada en la recuperación del estrés por altas temperaturas, mediante la extracción de proteínas 6 horas después de transferidas las plantas a condiciones normales de crecimiento. Todos los tratamientos analizados resultaron en una mayor acumulación de la proteína de fusión, comparado con los controles, lo cual indica que la construcción se encuentra regulada correctamente, y que los niveles de expresión génica y proteica son similares (fig. 23D).

Estas líneas transgénicas fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia confocal, pudiéndose observar una localización consistente con la observada en el sistema heterólogo, formando acúmulos citoplasmáticos en situaciones normales de crecimiento, aumentando no solamente la cantidad sino el tamaño de estos acúmulos cuando la proteína se encuentra en condiciones de estrés. Las imágenes del microscopio de fluorescencia sugieren además que estos acúmulos se encuentran en las cercanías de los cloroplastos, sugiriendo un posible rol para esta proteína en asociación con estos organelos (fig. 23E-I, II).

Discusión

A pesar de que existe muchos datos de la estructura, regulación génica y función de la familia de genes sHSPs vegetales, el rol específico que ejercen estas proteínas en la tolerancia al estrés abiótico es todavía escaso. En este trabajo, se caracterizó por primera vez esta familia de genes en *P.patens*, determinando la existencia de al menos 22 genes que codifican para sHSPs en esta planta. Una de los genes encontrados mediante la generación de una biblioteca substractiva enriquecida en cDNAs inducidos por ABA, fue *PpHsp16.4*, el cual codifica para una proteína de 16.4 kDa perteneciente a la subfamilia de clase II de HSPs. Mediante estudios de Northern blot se pudo demostrar que *PpHsp16.4* tiene una expresión basal, y se induce en respuesta a la exposición a varias condiciones de estrés, entre las cuales se incluyen luz fuerte, altas temperaturas, salinidad y estrés osmótico. Nuestros resultados demuestran que *PpHsp16.4* también se acumula luego de tratamientos con las hormonas ABA y SA, hormonas que han sido vinculadas a la señalización del estrés por altas temperaturas y la termotolerancia basal de las plantas (Larkindale y Huang 2004; Larkindale et al., 2005). Se ha demostrado que el SA induce la expresión de varias sHSPs en *A.thaliana* (Clarke et al., 2004; Chang et al., 2007) y en *P.patens* (Saidi et al., 2007), lo cual sugiere una conservación en las vías de regulación

entre estas angiospermas y musgos. Aunque el rol de estas hormonas en la regulación de la expresión de sHSPs durante el estrés por altas temperaturas todavía no está claro (Larkindale et al., 2005; Kotak et al., 2007), se han encontrado altos niveles tanto de SA como de ABA en varias especies vegetales en respuesta a este estrés (Larkindale y Huang 2004; Clarke et al., 2004; Liu et al., 2006).

El estrés por altas temperaturas y el estrés osmótico se acompañan por un estrés oxidativo. El rol que cumplen las sHSPs en la tolerancia a este tipo de estrés se encuentra asociado a la producción y acumulación de este tipo de proteínas en respuesta a tratamientos *in vitro* con H₂O₂. Debido a que los cloroplastos son la mayor fuente de generación de ROS bajo estas condiciones de estrés, y también bajo condiciones normales (Asada et al., 1994), las sHSPs que se localizan en este organelo podrían estar involucradas en la tolerancia al estrés oxidativo. La sobreexpresión de *AtHsp25.3* confiere tolerancia tanto al estrés por altas temperaturas como por altas intensidades de luz, los cuales inducen un estrés oxidativo (Harndahl et al., 1999). Por otro lado, la expresión inducida por estrés oxidativo de sHSPs mitocondriales (Banzet et al., 1998) y citosólicas (Sun et al., 2001; Pla et al., 1998) sugiere que también este tipo de sHSPs podrían contribuir a la tolerancia al estrés oxidativo. En células de mamíferos, las sHSPs son capaces de disminuir los niveles intracelulares de ROS, mediante la vía dependiente de glutatión (Arrigo 1998). En el caso de *PpHsp16.4* de *P.patens*, no se vio inducción con factores que generen estrés oxidativo, como H₂O₂ o MV, lo cual fue un resultado inesperado, ya que la mayoría de los genes de sHSPs de tipo CI y CII de otras especies vegetales se encuentran inducidas por estrés oxidativo (Waters 2013).

Mediante la generación de un mutante *knockout* en *P.patens* de *PpHsp16.4* se pudo demostrar que aunque no se vieron diferencias fenotípicas entre los genotipos salvajes y mutantes cuando fueron crecidas en presencia de altas concentraciones de sal, en estrés osmótico o luego de la incubación con altas temperaturas, este gen fue fundamental cuando las plantas se recuperaron de estos tipos de estrés, siendo los mutantes incapaces de recuperarse luego de estos tratamientos prolongados. Nuestros datos fueron consistentes con otros estudios que demuestran que la capacidad de *P.patens* de sobrevivir al estrés radica en emplear mecanismos moleculares que protegen la integridad celular durante el estrés, permitiendo la reparación del daño cuando se pasan a condiciones normales (Saavedra et al., 2006; Frank et al., 2005; Khandelwal et al., 2010). En este contexto, y corroborando otros modelos actuales del mecanismo de acción de algunas sHSPs (Waters 2013), *PpHsp16.4* podría contribuir a la tolerancia al estrés mediante la prevención de la agregación irreversible de proteínas inducida por estrés, en conjunto con otras chaperonas.

Se ha visto que este tipo de proteínas tienen diferentes localizaciones subcelulares, siendo sin lugar a dudas el citosol el compartimento donde mayormente se acumulan. En *P.patens*, 14 de las proteínas deducidas presentes en el genoma tienen una localización predicha a este compartimento, siendo el resto derivadas a la mitocondria o cloroplasto. La generación de líneas *knock-in* en *P.patens* que expresan la proteína fluorescente citrina fusionada al extremo C-terminal de *PpHsp16.4* nos permitió examinar la localización

subcelular y determinar la regulación espacio-temporal de la proteína de fusión, cuando la misma se encuentra regulada bajo el promotor endógeno del mismo gen. Mediante la visualización de uno o varios cuerpos fluorescentes en el citoplasma de las células, se pudo demostrar que PpHsp16.4 se expresa en todos los tejidos celulares bajo condiciones de crecimiento normal. Interesantemente, estas estructuras se visualizaron siempre localizadas en las inmediaciones de los cloroplastos, lo cual podría sugerir que esta proteína podría tener un rol asociado a las funciones de estos organelos. Los cloroplastos son los primeros organelos blanco del daño causado por altas intensidades de luz, lo cual interfiere con la fotosíntesis oxigénica, un fenómeno denominado fotoinhibición (Powles 1984), y la exposición de las plantas a un exceso de luz induce la acumulación de PpHsp16.4. Además, un estudio reciente demostró que una sHSP citosólica de clase I de *A.thaliana* denominada Hsp17.8 juega un rol bajo condiciones normales en dirigir proteínas a las membranas externas de los cloroplastos (Kim et al., 2011). En este trabajo, estos autores demostraron que en células no estresadas, Hsp17.8 actuaría como una proteína cofactor ankirina 2A (AKR2A), dirigiendo proteínas hacia el cloroplasto. Sin embargo, bajo condiciones de altas temperaturas, la expresión de este gen aumenta y la proteína se convierte en una proteína oligomérica, tal como se ha demostrado con otras sHSPs.

Además de la determinación subcelular de la proteína de fusión PpHsp16.4-Citrina en *P.patens*, se utilizaron plantas de tabaco y *A.thaliana* para demostrar que PpHsp16.4 se encuentra en forma de acúmulos cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés, lo cual concuerda con los gránulos inducidos por altas temperaturas observados por Low y colaboradores en el 2000. Estas estructuras fluorescentes representan posiblemente complejos oligoméricos de PpHsp16.4, lo cual ya es conocido para este tipo de proteínas (Waters 2013; Baldwin et al., 2011). Luego de un estrés osmótico o por altas temperaturas, se observó una alta expresión de PpHsp16.4 tanto a nivel transcripcional como proteico, y las señales citosólicas de la proteína de fusión se convirtieron en largas estructuras, consistentes con complejos proteicos oligoméricos. Esto concuerda con el hecho de que PpHsp16.4 podrían actuar como chaperona en respuesta al estrés, uniéndose a proteínas desnaturalizadas y previniéndolas de formar agregados, tal como se ha propuesto para algunas sHSPs (Nakamoto y Vigh 2007).

3- Caracterización funcional de PpCOR413 de P.patens

PpCOR413 corresponde a un gen de *P.patens* (Phypa_28204), inducido fuertemente por ABA, que pertenece a la familia de las proteínas WCOR413, descrita por primera vez en trigo (Breton et al 2003). Este gen no presenta intrones en su secuencia, y codifica para una proteína rica en serinas, de 27 kDa.

Análisis bioinformáticos de predicción de la localización subcelular de los distintos miembros de la familia WCOR413 de *A. thaliana* y de trigo, realizados por Breton y colaboradores (2003), sugirieron que esta familia está compuesta por proteínas que contienen entre 4 y 6 dominios transmembrana (TrM), y que se podrían dividir en dos grupos en base a su posible localización subcelular: por un lado, las proteínas de membrana plasmática (WCOR413-PM) y por otro lado, las localizadas en la membrana de los tilacoides (WCOR413-TM).

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas similares, (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), en el presente trabajo se pudo determinar la posible existencia de 5 dominios TrM en la secuencia aminoacídica de PpCOR413. A su vez, la proteína presenta una localización subcelular predicha cloroplástica, por lo que formaría parte del grupo de las COR-TM. PpCOR413 tiene un 37% de identidad con la proteína Bradi2g16300.2 de *Brachypodium distachyon* (24 kDa), la cual tiene 4 dominios TrM. Esta planta tiene en su genoma 3 genes que codifican para este tipo de proteínas, de las cuales en el 2014 el grupo de Colton-Gagnon y colaboradores caracterizaron una de ellas, a la cual denominaron BradiCOR413 (Bradi1g07441.1). Esta proteína se acumula luego de tratamientos con bajas temperaturas y podía ser utilizado como indicador de la tolerancia al frío en esta planta (Colton-Gagnon et al., 2014), y tiene un peso molecular de 22.8 kDa, con 5 dominios TrM en su secuencia. Las otras secuencias de proteínas WCOR413 encontradas en el genoma de *P.patens* se denominaron PpCOR1 (Phypa_181142), PpCOR2 (Phypa_105296), PpCOR3 (Phypa_122476), PpCOR4 (Phypa_137869), PpCOR5 (Phypa_122476) y PpCOR6 (Phypa_137869). Las secuencias aminoacídicas deducidas de PpCOR2, PpCOR3 y PpCOR6 presentan 4 dominios TrM, mientras que PpCOR1 y PpCOR4 presentan 5 de estos dominios y PpCOR5 solo 3. PpCOR3 y PpCOR5, y PpCOR4 y PpCOR6 tienen el mismo número de Phypa, lo que indica que las proteínas traducidas son productos de splicing alternativos del mismo gen.

Se analizó la relación filogenética entre estas proteínas de *P.patens* y las de otras plantas, incluyendo *A.thaliana*, trigo y *B.distachyon*, utilizando el alineamiento de las secuencias por ClustalW (Thompson et al., 1997) seguido por el algoritmo neighbor-joining empleando el programa MEGA 6.06. Los resultados de este estudio claramente separan a PpCOR413 del resto de las proteínas WCOR413 de *P.patens*, y la posicionan en el mismo grupo de la de *Brachypodium* y trigo. En estos resultados también se puede ver que PpCOR1 a PpCOR6 se encuentran agrupadas en un cluster formado por las 6 proteínas (fig. 24).

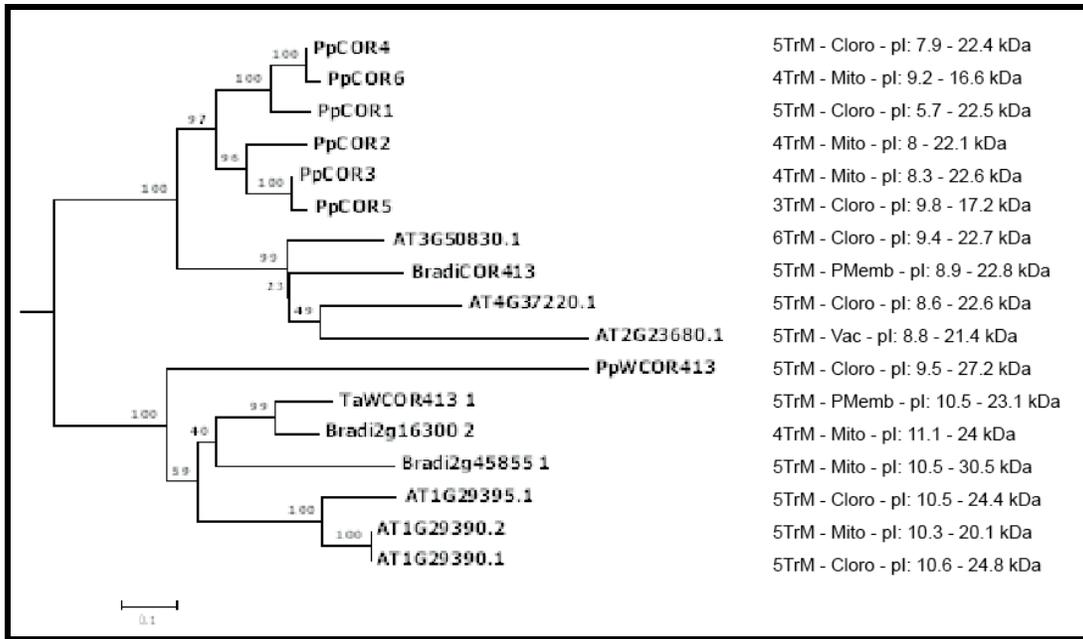


Figura 24: Relación filogenética entre proteínas WCOR413 de *P.patens* (Pp), *A.thaliana* (At) y *B.distachyon* (Bradi). El árbol filogenético fue construido por el método de neighbor-joining. A la derecha se muestra la cantidad de dominios transmembrana deducidos en cada secuencia aminoacídica (TrM), los puntos isoeléctricos estimados (pI), el peso molecular en kDa y la localización predicha de cada proteína. Cloro: cloroplasto; Mito: mitocondria; Vac: vacuola; PMemb: Membrana plasmática. Los valores Bootstrap se muestran en cada nodo. La barra representa 0,1 sustituciones por posición de aminoácidos.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento sobre la posible función del gen *PpCOR413* en distintas condiciones de estrés, en este trabajo se analizó el perfil de expresión de este gen en respuesta a diversos factores de estrés, así como al tratamiento con hormonas o compuestos químicos que afectan la homeostasis celular. Para ello, se aisló ARN total de plantas controles (Ctrl) y tratadas con hormonas como ABA y SA, compuestos químicos causantes de desnaturalización de proteínas como el DTT, y diferentes condiciones de estrés abiótico como manitol, NaCl, altas y bajas temperaturas, UVB o altas intensidades de luz. Todos los tratamientos fueron realizados por un período de 24 horas, con excepción de la exposición a altas intensidades de luz que se realizó durante 2 horas. Se analizaron los niveles de acumulación del transcripto de *PpCOR413* mediante Northern blot, utilizando como sonda la secuencia completa de cDNA del gen (fig. 25).

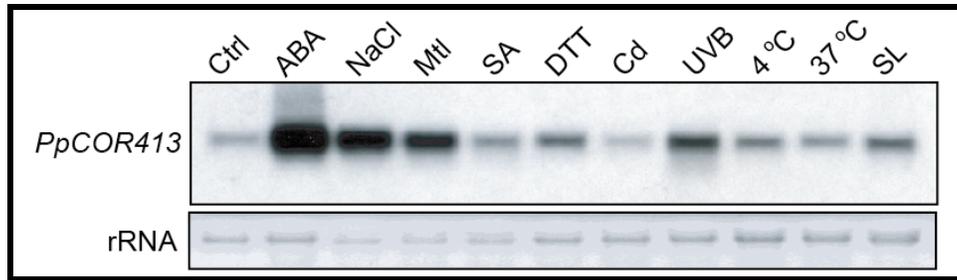


Figura 25: Análisis por Northern blot de plantas de *P. patens* salvajes controles (Ctrl), tratadas con 50 μ M ABA, 200mM NaCl, 400mM Manitol (Mtl), 1mM SA, 10mM DTT, 10mM cadmio (Cd), UVB, bajas temperaturas (4°C), altas temperaturas (37°C) y altas intensidades de luz (SL). Se utilizó como sonda de hibridación la secuencia completa de cDNAs de *PpCOR413* marcada con [α^{32} P]-dCTP. El ARNr teñido con bromuro de etidio fue utilizado como control de carga de las muestras de ARN.

Se pudo determinar que *PpCOR413* se encuentra fuertemente inducido por tratamientos con ABA y por estrés salino y osmótico, además de estar levemente inducido por tratamientos con UVB y DTT. Los niveles de inducción en respuesta a SA, altas y bajas temperaturas y altas intensidades de luz no fueron significativos, aunque sí se ve un aumento con respecto al control (fig. 25).

a) Estudios de localización de PpCOR413

Para confirmar la localización cloroplástica de PpCOR413, predicha mediante estudios bioinformáticos, se realizó una construcción génica donde se clonó la secuencia codificante de *PpCOR413* en marco con la proteína fluorescente GFP, en un vector binario, controlado bajo el promotor constitutivo 35S. Esta construcción fue, por un lado, introducida en una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* con la cual se infiltraron hojas de tabaco, y por otro lado se transformaron protoplastos de tabaco mediante permeabilización de la membrana por electroporación.

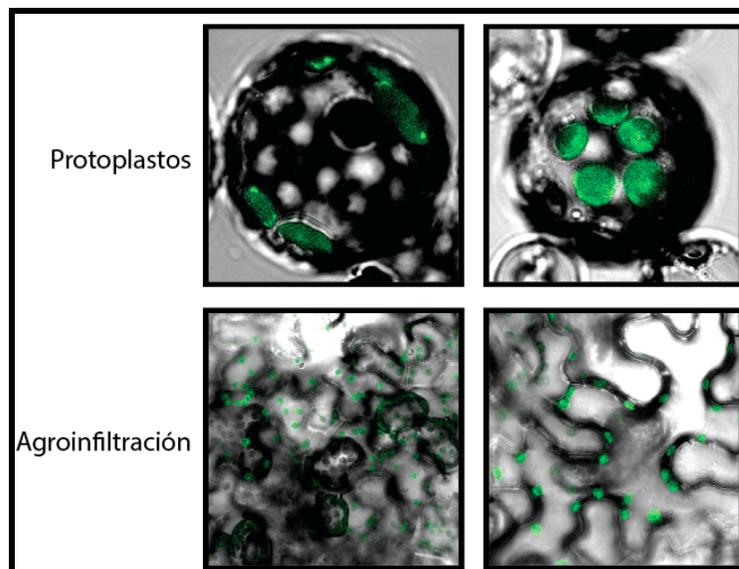


Figura 26: Localización subcelular de PpCOR413. Imágenes de microscopio confocal de hojas de tabaco agroinfiltradas con la construcción PpCOR413:GFP y de protoplastos de la misma planta.

La visualización en un microscopio confocal de las hojas agroinfiltradas y de los protoplastos transformados confirmó que PpCOR413 se localiza en los cloroplastos (fig. 26). Esto concuerda con los análisis realizados a nivel bioinformático, donde se pudo ver que esta proteína contiene un péptido señal hacia el cloroplasto. Tomando en cuenta que esta proteína presentaría dominios TrM, y que existen reportes de la literatura que demuestran que algunas proteínas cloroplásticas de la familia WCOR413 son proteínas intrínsecas de la membrana de los tilacoides, estos datos en conjunto sugieren fuertemente que PpCOR413 estaría inserta en la membrana tilacoidal de los cloroplastos de *P.patens*.

b) Generación, caracterización molecular y fenotípica de mutantes *knockout* de *PpCOR413* en *P.patens*

Si bien el genoma de *P.patens* codifica para 5 genes de la familia WCOR413, *PpCOR413* es único en cuanto que difiere significativamente del resto en su secuencia y se agrupa con otros genes de plantas vasculares. En este trabajo se estudió la función de este miembro de la familia WCOR413 de *P.patens*, mediante genética reversa. Para ello, se generó una construcción para el reemplazo del gen mediante recombinación homóloga (fig. 27A), en la cual se clonó un fragmento de 803 pb de la región 5', y un fragmento de 771 pb de la región 3' del gen, flanqueando el cassette de resistencia a kanamicina (nptII). Con esta construcción, se transformaron protoplastos de *P.patens* mediante permeabilización de la membrana por calor y con el agente PEG según Schaefer y colaboradores (Schaefer et al., 1991), y se plaquearon las células resultantes de la transformación en un medio de cultivo suplementado con manitol. La selección de las colonias individuales crecidas luego de varios pasajes a medio de crecimiento con y sin el antibiótico de selección fue realizada mediante PCR (fig. 27B). Para ello se utilizó un primer reverso específico para una región dentro del cassette de selección (primer b) junto con un primer forward (primer a) localizado en la región genómica por fuera de la construcción, upstream del gen *PpCOR413*. De manera similar, se utilizó un primer forward localizado en la secuencia del cassette de selección (primer c) junto con un primer reverso (primer d) que se une a la región genómica por fuera de la construcción, downstream al gen. Los tamaños esperados de estos productos de PCR son de 1300 pb y 1370 pb, para los fragmentos 5' y 3' respectivamente. Por último, y para demostrar si esta línea incorporó correctamente la construcción mediante recombinación homóloga, incorporando una única copia en el locus deseado, se realizó una reacción de PCR con los primers a y d, ambos por fuera de la construcción de reemplazo, lo cual se espera que genere un fragmento de 2230 pb para el genotipo salvaje, y un fragmento de 3928 pb para el genotipo mutante. Los resultados de estos análisis confirmaron la obtención de un mutante knockout, que insertó una copia del gen por recombinación homóloga en el locus esperado (fig. 27B). Para confirmar que el mutante generado era haploide, se realizó un estudio de ploidía mediante citometría de flujo, demostrando que, al igual que el genotipo salvaje, el mutante *cor413* es haploide (fig. 27C).

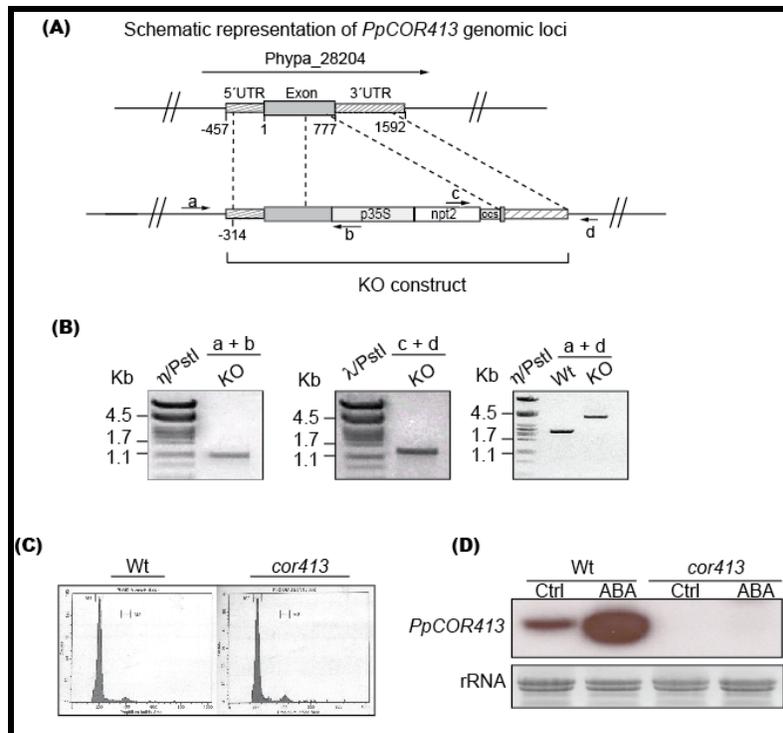


Figura 27: Generación del mutante *knockout* en el loci de *PpCOR413*. (A) Estructura genómica de *PpCOR413* y luego de la construcción de reemplazo. La posición de los primers utilizados para el análisis por PCR de las plantas salvajes (WT) y mutantes se indican con flechas. (B) Análisis por PCR del mutante (KO), utilizando primers específicos en regiones del genoma, primers a y d, y en el cassette de selección, primers b y c. (C) Análisis de la ploidía de muestras de *P.patens* salvajes (wt) y mutante para *PpCOR413*. (D) Análisis por Northern blot de plantas salvajes y de la línea *knockout* (KO), utilizando ARN total aislado de plantas tratadas con ABA 50 μ M durante 24 horas o de plantas controles (Ctrl). Como sonda se utilizó cDNA de la secuencia completa de *PpCOR413* marcado radiactivamente.

Para confirmar la pérdida de función del gen *PpCOR413* en la línea mutante, se analizó la acumulación del transcripto mediante Northern blot, luego de tratar las plantas salvajes y mutantes con la hormona ABA, condición en la cual se induce la expresión del gen. Los resultados de estos estudios muestran claramente que el genotipo *cor413* no presenta expresión del gen (fig. 27D).

En suma, los la caracterización molecular del genotipo *cor413* obtenido indica que esta línea exhibe una expresión nula del gen *PpCOR413*, debido a la correcta integración de la construcción de reemplazo en el locus deseado.

La falta de *PpCOR413* afecta el crecimiento de las plantas en estrés lumínico

La caracterización fenotípica del mutante *knockout cor413* se realizó tomando como criterio, por un lado, el perfil de expresión del gen; y por otro, la localización subcelular de la proteína. Nuestros resultados indicaron que *PpCOR413* tiene una leve expresión constitutiva en condiciones óptimas de crecimiento, la cual se ve incrementada principalmente, pero no exclusivamente, en respuesta al estrés osmótico o salino y frente al agregado de ABA. Con estos antecedentes, se realizaron ensayos de crecimiento de la planta mutante comparada con la salvaje en diferentes concentraciones de NaCl (100mM y 200mM), de manitol (300mM y 400mM), y de ABA (2 μ M y 4 μ M), la cual inhibe el

crecimiento de la planta. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos. Además de esto, también se realizaron ensayos de supervivencia al estrés salino y osmótico severo, NaCl 500mM y manitol 900mM, respectivamente, sin observar diferencias fenotípicas entre genotipos, tanto durante el estrés como durante la recuperación del mismo. Por otro lado, y dado que PpCOR413 pertenece a la familia de proteínas inducidas por bajas temperaturas, se analizó de manera preliminar este tipo de estrés en las plantas mutantes y salvajes. Debido a la falta de equipamiento que disponemos en el Laboratorio para realizar este tipo de ensayos, solamente se pudieron realizar ensayos con un control inespecífico de la temperatura ensayada. Para ello se crecieron plantas de ambos genotipos en condiciones normales durante 20 días, y luego se aclimataron durante 4 días a 0°C.

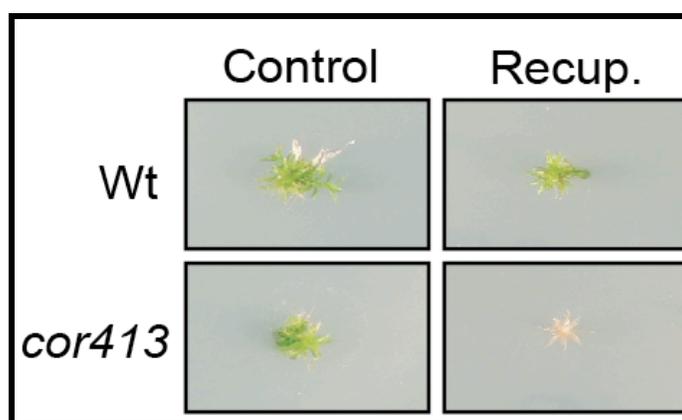


Figura 28: Efecto de bajas temperaturas en *P. patens*. Se crecieron colonias de *P. patens* salvajes y mutantes *cor413* en medio normal y luego de 20 días se aclimataron durante 4 días a 0°C. Se separaron 10 gametóforos aislados de cada genotipo y se incubaron en agua durante 75 minutos a -10°C. Las plantas tratadas fueron pasadas a medio normal y se recuperaron durante 4 días.

Se cortaron 10 gametofitos aislados de cada uno de los genotipos y se sumergieron en 10 mL de agua destilada estéril en una placa de petri y se realizó un tratamiento de 75 minutos a -10°C en un freezer. Las plantas fueron nuevamente transpasadas a medio de cultivo y se permitió la recuperación a temperatura de 23°C. En este caso sí se observaron diferencias a nivel del fenotipo entre la línea *knockout* y la línea salvaje. Mientras que esta última fue capaz de recuperarse del estrés por congelamiento luego de 4 días de crecimiento a temperaturas óptimas, el genotipo mutante *cor413* no mostró signos de recuperación (fig. 28). Estos resultados no pudieron ser reproducidos, debido a la dificultad para controlar las temperaturas bajo cero con el equipamiento disponible.

Por último, y dado que se trata de una proteína de localización cloroplástica, probablemente ubicada en la membrana de los tilacoides, se realizaron ensayos de crecimiento en condiciones de estrés lumínico y se evaluó la tasa de crecimiento del genotipo mutante y del salvaje en el tiempo. *P. patens* crece en una intensidad lumínica óptima entre 50 y 70 $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$, por lo tanto, una intensidad de luz de 350 $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$ representa un estrés importante para esta especie.

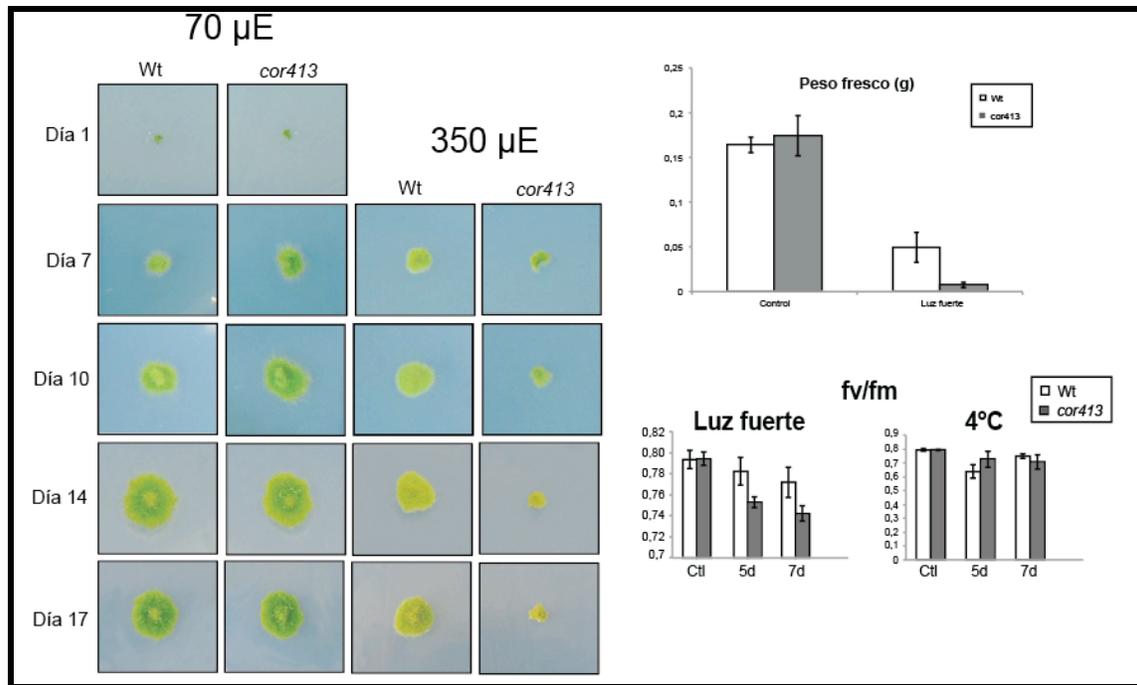


Figura 29: Análisis de crecimiento de plantas salvajes (Wt) y *knockout* para *PpCOR413* (*cor413*) en condiciones de intensidades de luz normal (70µE) y en altas intensidades de luz (350µE). Se crecieron ambos genotipos en la misma placa de petri y se dejaron crecer durante 17 días a las intensidades descritas, fotografiándose los días 1, 7, 10, 14 y 17 de crecidas. Luego de 17 días se pesaron las colonias por separado y se graficó el peso fresco. Para las medidas de fv/fm, se crecieron colonias de ambos genotipos en condiciones normales durante 20 días (control) y se realizaron tratamientos de 5 y 7 días con altas intensidades de luz y con bajas temperaturas (4°C).

Para estos análisis se crecieron ambos genotipos (crecidos paralelamente en la misma placa de petri) en condiciones de crecimiento de intensidad de luz normal (70 $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$) y también en condiciones de altas intensidades de luz (350 $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$). Se dejaron crecer durante 17 días y se registraron imágenes mediante fotografías (fig. 29). Como se puede observar en la figura, no hay diferencias significativas en la tasa de crecimiento entre el mutante *knockout cor413* y el genotipo salvaje en condiciones controles. Sin embargo, cuando las plantas fueron expuestas a alta intensidad de luz, la diferencia entre ambos genotipos es muy significativa, observándose prácticamente una total inhibición del crecimiento en el mutante *knockout*. Con estos antecedentes, se procedió a estudiar la eficiencia del aparato fotosintético, a través del análisis de parámetros de fluorescencia. Para ello, se crecieron colonias de plantas salvajes y *knockout* en condiciones normales durante 20 días, y luego se hicieron tratamientos tanto de estrés lumínico (350 $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$) como con bajas temperaturas (4°C) durante 5 y 7 días. Las colonias tratadas fueron aclimatadas en oscuridad durante 10 minutos, a temperatura ambiente para las plantas con estrés lumínico, y a 4°C para las plantas con estrés con bajas temperaturas. Cada colonia fue colocada en una pinza y se midió el coeficiente Fv/Fm con un medidor de la fluorescencia de la clorofila (PAM), utilizando una luz actínica de base de 1000 $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$ y pulsos de luz saturante en aumento (2500, 5000, 7600, 10000 y 13000 $\mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$). Las plantas mutantes *cor413* presentaron una menor eficiencia máxima del PSII que las de genotipo salvaje, tanto en condiciones

normales como luego de 5 y 7 días de tratamiento con estrés lumínico. Por otro lado, cuando se realizan tratamientos con bajas temperaturas, este coeficiente no varió (fig. 29).

La similitud estructural entre la familia de proteínas COR413 y los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Bockaert y Pin 1999), llevaron a Breton y colaboradores a generar la hipótesis de que esta familia de proteínas podría estar asociada a la señalización del estrés ambiental (Breton et al., 2003). Por otro lado, al tener PpCOR413 una localización en la membrana tilacoidal, podría estar involucrada en mantener la integridad de estas membranas durante condiciones de estrés por altas intensidades de luz. Las plantas son capaces de adaptarse a cambios en la intensidad de luz mediante ajustes en el aparato fotosintético. Estas adaptaciones van desde respuestas biofísicas y bioquímicas, hasta cambios a nivel de la estructura de los cloroplastos, en particular, de los tilacoides. Tomando en cuenta el fenotipo alterado frente a la exposición a luz fuerte del mutante *cor413*, en este trabajo se empleó microscopía electrónica para analizar los posibles ajustes estructurales de las granas tilacoidales en plantas de los genotipos mutante y salvaje, tanto en condiciones óptimas de luz, como expuestas a intensidades de luz fuerte. Para estudiar si existen diferencias morfológicas entre ambos genotipos, en primer lugar se visualizaron los gametofitos de las plantas mutantes y salvajes en un microscopio electrónico, mediante lo cual no se observaron diferencias entre ambas plantas. En segundo lugar, se incluyeron muestras de plantas mutantes y salvajes crecidas en condiciones normales (controles) y tratadas durante 48 horas a altas intensidades de luz ($350 \mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$). Para ello se fijaron las muestras con salvajes y mutantes en 3,5% de glutaraldehído durante toda la noche y se realizaron bloques de gametofitos como se describe en Materiales y Métodos, para luego realizar cortes finos de 50nm con un ultramicrotomo. Estos cortes fueron visualizados en un microscopio electrónico de transmisión acoplado a una cámara digital.

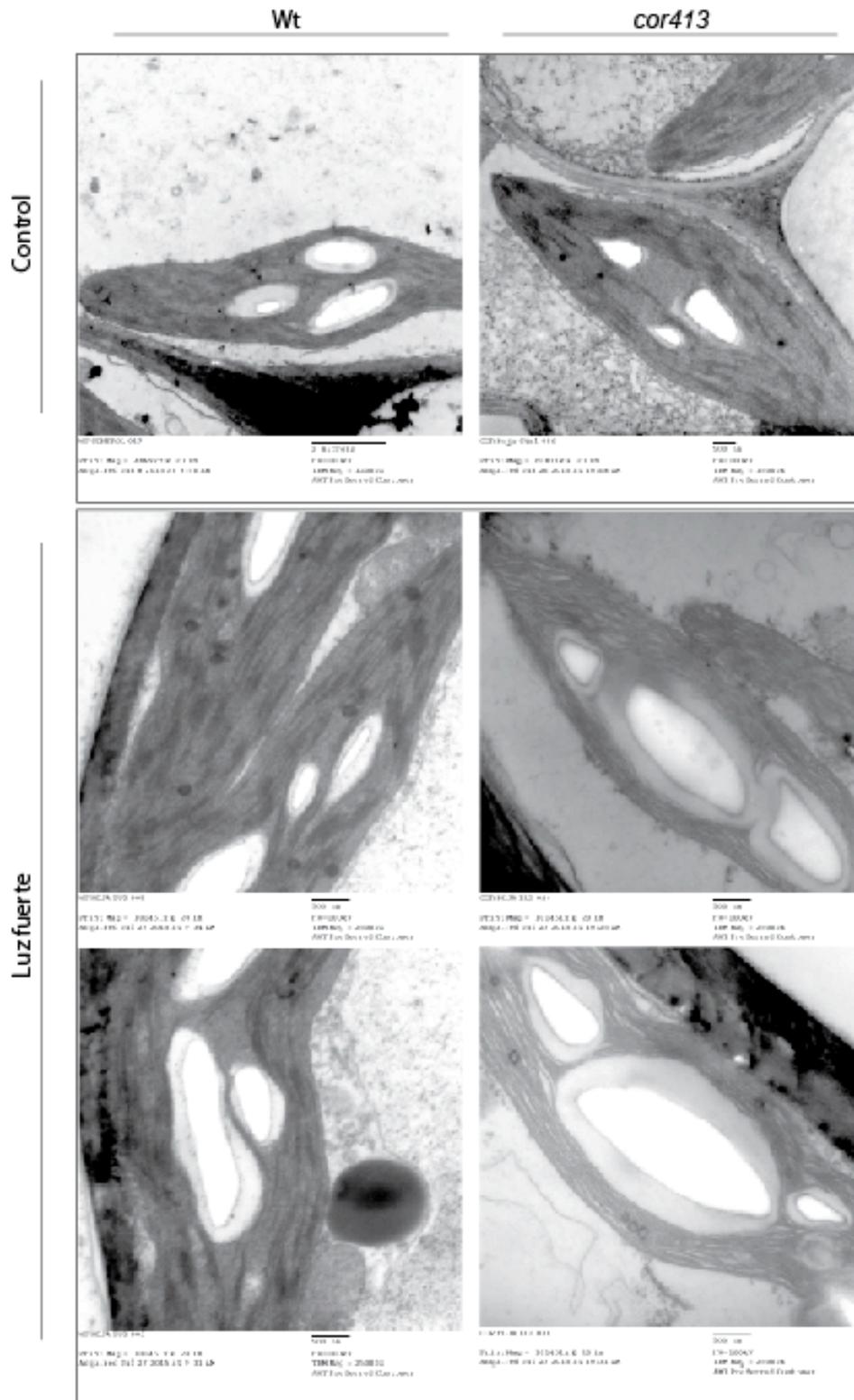


Figura 30: Imágenes de *P.patens* de microscopio electrónico de transmisión. Gametofitos de plantas salvajes y mutantes de *P.patens* controles y tratadas durante 48 horas con altas intensidades de luz ($350 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) fueron fijadas en 3,5% de Glutaraldehído y se realizaron cortes de 50nm de espesor utilizando un ultramicrotomo RMC, MT-X. Estos cortes fueron visualizados en un microscopio electrónico de transmisión Jeol, JEM 1010, acoplado a una cámara digital.

Aunque no se detectaron diferencias morfológicas a nivel celular entre ambos genotipos en las plantas controles, cuando las plantas fueron tratadas con altas intensidades de luz, se observó una morfología diferente en los cloroplastos entre las plantas salvajes y mutantes. Mientras que las membranas tilacoidales del genotipo salvaje se encuentran agrupadas en granas, de tamaño y distribución normal, en el genotipo *cor413*, los tilacoides están dispuestos en forma laxa y no apliados formando granas. Estos resultados sugieren que PpCOR413 podría tener una función estructural que module ajustes en la actividad fotosintética o que proteja el aparato fotosintético en condiciones de un estrés lumínico.

El hecho de que PpCOR413 sea una proteína de la membrana tilacoidal, y que el mutante en resulte en un fenotipo marcado cuando *P.patens* se encuentra en condiciones de altas intensidades de luz, podría sugerir que PpCOR413 juegue un rol en la protección de la fotosíntesis mediante la interacción con proteínas del PSII. Para ello, se realizaron estudios por Northern Blot con ARN de plantas salvajes y mutantes *cor413*, tratadas durante 24 horas con ABA, altas intensidades de luz ($350 \mu\text{moles.m}^2.\text{s}^{-1}$) como con bajas temperaturas (4°C), utilizando como sondas cDNA completos de transcriptos que codifican para proteínas del PSII, como los son la proteína D1 (*PsbA*) y D2 (*PsbD*) (fig. 31). Bajo condiciones de crecimiento normal, no se ve aumento ni disminución significativa en los niveles de expresión de estos genes cuando se comparan las plantas salvaje con las mutantes. Sin embargo, se puede ver una marcada reducción en los niveles de *PsbA*, gen codificante para la proteína D1, en las plantas mutantes *cor413*, cuando se realizan tratamientos con frío o altas intensidades de luz. Estos resultados demuestran que la ausencia de PpCOR413 causa una reducción significativa en los niveles de proteínas del PSII luego de estos tratamientos, sugiriendo un rol en la protección de este complejo de proteínas.

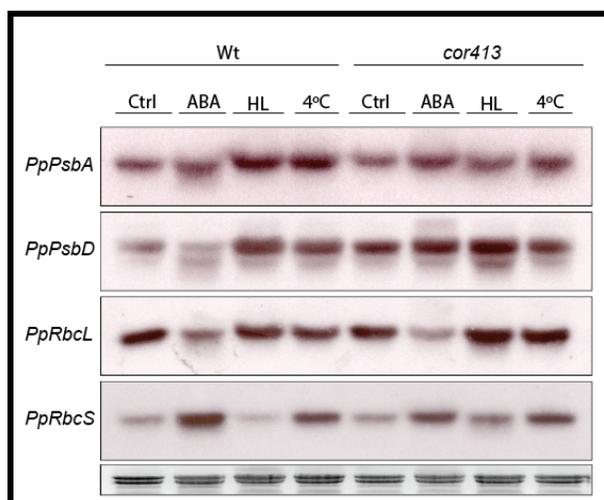


Figura 31: Análisis por Northern blot de plantas de *P.patens* salvajes controles (Ctrl), tratadas con $50\mu\text{M}$ ABA, altas intensidades de luz (HL) y bajas temperaturas (4°C), durante 24 horas. Se utilizó como sonda de hibridación las secuencias completas de cDNAs de *PpPsbA*, *PpPsbD*, *PpRbcS* y *PpRbcL* marcadas con $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$. El ARNr teñido con bromuro de etidio fue utilizado como control de carga de las muestras de ARN.

En el caso de *PsbD*, gen que codifica para D2, la inducción del mismo se ve aumentada en las plantas mutantes *cor413*, sobre todo luego de tratamientos con ABA. El primer paso en la biosíntesis del ABA ocurre en los cloroplastos, generando xantoxina, la cual es transportada hacia el citosol y oxidada a ABA aldehído para luego ser convertida finalmente a ABA (Nambara y Marion-Poll 2005). Además de restringir la disponibilidad del CO₂ mediante la estimulación del cierre de los estomas, el ABA tiene también un efecto a largo plazo en la fotosíntesis, mediante la inhibición de la formación de los tilacoides, de la biosíntesis de clorofila y en la función de la Rubisco (Lichtenthaler y Becker 1970; Khokhlova et al., 1978; Kusnetsov et al., 1998). Pero el efecto del ABA en la fotosíntesis se encuentra relacionado con una reducción en los niveles de transcriptos que codifican para proteínas cloroplásticas (Cutler et al., 2010; Fujita et al., 2011). El hecho de que la inducción de *PsbD* en respuesta a ABA se encuentre aumentada en el mutante *cor413*, sugiere que PpCOR413 podría a su vez tener un rol de señalización en los cloroplastos, ABA dependiente.

Por otro lado, y dado que esta reducción en proteínas del PSII no se observó en otros complejos fotosintéticos, como lo son las subunidades RbcS y RbcL de la Rubisco, codificantes para la subunidad pequeña y larga de esta proteína, respectivamente, se puede concluir que la fotosíntesis no está afectada, sino solamente la estructura del complejo de proteínas del PSII (fig. 31).

Discusión

A pesar de la gran cantidad de información que existe acerca de las proteínas COR, se sabe muy poco en particular sobre la familia WCOR413. Estas proteínas, reportada por Breton et al (2003) fue descrita como una familia de proteínas de trigo de localización de membrana plasmática o de membrana tilacoidal. Ambos tipos tienen entre 4 a 6 dominios transmembrana (TrM) bien definidos. Luego de la descripción propuesta por este grupo de trabajo, otros investigadores han estudiado proteínas de esta familia en diferentes especies vegetales, como trigo, *A.thaliana* y *B.distachyon*, (Okawa et al., 2008; Breton et al. 2003; Maruyama et al. 2004; Colton-Gagnon et al., 2014).

En este trabajo se estudió la familia de proteínas WCOR413 en *P.patens*, donde se encontraron por lo menos 7 proteínas codificadas en su genoma, todas ellas conteniendo dominios transmembrana. En este trabajo nos centramos en la caracterización funcional de un miembro de la familia WCOR413 de *P.patens*, por presentar un perfil de expresión de inducción por ABA. El análisis filogenético de *PpCOR413* ubicó a esta proteína en un cluster filogenético diferente al resto de las proteínas WCOR413 encontradas en *P.patens*, posicionándose cerca de una proteína WCOR413 de trigo y una de *B.distachyon*. Mediante estudios de análisis bioinformáticos, se pudo determinar que PpCOR413 tiene 5 dominios TrM, y posee un péptido señal que la dirigiría al cloroplasto. Esta localización fue demostrada en este trabajo mediante la agroinfiltración de hojas y la electroporación de protoplastos de plantas de tabaco con la proteína de fusión PpCOR413:GFP.

Con el objetivo de generar conocimiento acerca de la función de PpCOR413, se utilizó un enfoque de genética reversa, a través de la generación y caracterización de un mutante

knockout para este gen en *P.patens*. El mutante mostró una clara alteración en el crecimiento en condiciones de luz fuerte. Cuando una planta es expuesta a altas intensidades de luz, los cloroplastos responden mediante la inducción de 3 diferentes mecanismos, los cuales comprenden: por un lado la disipación del exceso de energía, por otro lado mediante sistemas de detoxificación de productos dañinos producidos y por último mediante mecanismos que reducen la cantidad de luz absorbida por la planta.

En primer lugar, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos que facilitan la disipación del exceso de energía absorbido bajo estas condiciones de altas intensidades de luz, entre los cuales se incluyen la cloro-respiración, el flujo cíclico de electrones, la fotorespiración, y el quenching no-fotoquímico NPQ (Rumeau et al., 2007; Bauwe et al., 2010; de Bianchi et al., 2010; Johnson 2011). Dependiendo de las condiciones de luz, el NPQ puede representar hasta el 50% o más de la energía absorbida (Demmig-Adams et al., 1996), y por lo tanto es una de las rutas principales para la disipación de este exceso de energía. Por otra parte, para detoxificar los ROS acumulados, las plantas pueden utilizar enzimas o pigmentos para la conversión de estas especies en moléculas no dañinas. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX) son las responsables directas de la detoxificación del radical superóxido y H_2O_2 , respectivamente. Por otro lado, los pigmentos como carotenoides y tocoferoles pueden remover ROS mediante quenching químico y físico (Conn et al., 1991; Kobayashi y Della Penna 2008). El estudio de estos mecanismos de disipación de la luz absorbida en exceso en las plantas mutantes *cor413* están siendo estudiadas, no teniendo todavía resultados claros en este sentido. Se han puesto a punto y realizado varios ensayos de medida de NPQ y de Fv/Fm (indicador de la eficiencia máxima del PSII) en ambos genotipos, tanto en condiciones normales, como luego de tratamientos de luz fuerte y bajas temperaturas, variando también el tiempo de exposición. Las plantas mutantes *cor413* poseen un NPQ menor en condiciones de estrés lumínico, lo que indicaría que tiene una capacidad menor para disipar la energía absorbida en exceso (datos no mostrados). Lo que es más claro es la disminución significativa que tienen estas plantas en el coeficiente Fv/Fm, tanto en condiciones normales como luego de tratamientos con estrés lumínico, lo cual indicaría que *PpCOR413* es indispensable para el funcionamiento óptimo del PSII. Por otro lado, este coeficiente no se vio afectado luego de tratamientos con bajas temperaturas.

Queda claro que los ROS juegan un papel importante en la respuesta de los cloroplastos a las altas intensidades de luz, por lo que se preveen realizar estudios de enzimas detoxificantes y hacer medidas de acumulación de ROS en ambos genotipos.

Por último, y para estudiar si existen alteraciones a nivel de la estructura de los organelos en estas plantas, se visualizó la estructura celular mediante imágenes de microscopía electrónica realizada en estas plantas bajo condiciones controles y luego de 48 horas de tratamiento con altas intensidades de luz. El mutante *cor413* posee una estructura cloroplástica amorfa, sin presencia de granas visibles, y con tilacoides más laxos, indicando que esta proteína podría estar involucrada en permitir la estabilidad estructural de los tilacoides en *P.patens*. En un artículo publicado este año, Demmig-Adams reportaron en hojas de *Monstera deliciosa* mediante imágenes de microscopía electrónica

que las plantas tratadas con altas intensidades de luz mostraban estructuras cloroplásticas anormales, con granas sin apilar, similares a las visualizadas en los mutantes *cor413* (Demmig-Adams et al., 2015). Se han caracterizado varios tipos diferentes de reorganizaciones tilacoidales, entre los cuales se encuentran: (i) los rearrreglos de complejos proteínas-pigmentos entre las granas y regiones del estroma de manera de optimizar el uso de niveles de luz para la fotosíntesis, balanceando el transporte de la luz absorbida por LHCII hacia el PSII o el PSI, sin disipación de energía excitada (Willimas y Allen 1987; Allen 1992; Krause y Jahns 2004). (ii) Un cambio en la distribución de las fracciones de energía excitada hacia los dos fotosistemas luego de un exceso de luz durante un estrés por deshidratación (lo cual involucra una disminución en la absorción por el PSII, un aumento de la absorción por el PSI, un aumento en el flujo cíclico de electrones, y un aumento en NPQ), lo cual fue demostrado por Zivak y colaboradores (Zivak et al., 2013). (iii) Con respecto al NPQ, Betterle y colaboradores en el 2009, dieron evidencia directa entre NPQ con cambios en la estructura del PSI, lo cual involucra una redistribución en los complejos del core del PSII con las membranas de la grana cuando se desarrolla el NPQ (Horton 2014). Por otro lado, en las cloroplastos que tienen las membranas tilacoidales sin apilar, más del 50% de los complejos proteicos son móviles, mientras que este número disminuye hasta el 20% cuando las granas se encuentran apiladas (Garab 2014; Kirchhoff et al., 2013).

Todos estos hallazgos nos acercan a la posibilidad de que *PpCOR413* podría estar involucrada en mantener la estabilidad de las membranas tilacoidales que forman las granas, generando granas sin apilar cuando la planta sufre un exceso de energía y es incapaz de disipar este exceso. Queda por determinar si *PpCOR413* se encuentra formando algún complejo proteico presente en el cloroplasto, mediante estudios de geles de poliacrilamida con proteínas aisladas de la membrana tilacoidal.

Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se estudió en detalle un grupo de genes identificados en *P.patens*, que codifican proteínas pertenecientes tres familias diferentes: DHNs, sHSPs y WCOR413. Los ensayos de expresión génica de estos genes sugieren la participación de los mismos en las respuestas a distintas condiciones de estrés abiótico, así como al ABA. Mediante estudios de genética reversa a través de la modificación dirigida de estos loci y la generación de mutantes *knockout* en *P.patens*, se obtuvieron resultados que indican que *PpDHNA*, *PpDHNB* y *PpHsp16.4* cumplen un rol importante en el proceso de recuperación de la planta, luego de su exposición a condiciones de estrés osmótico y salino. A su vez, *PpHsp16.4* participa de los mecanismos involucrados en la recuperación del estrés por altas temperaturas. En el caso del gen *PpCOR413*, el presente trabajo aporta la primera evidencia genética que le atribuye a un gen perteneciente a la familia de las WCOR413, una función en la respuesta adaptativa a la luz fuerte.

En segundo lugar, en este trabajo se profundizó en el estudio del mecanismo de acción de cada uno de los genes seleccionados para su caracterización. En cuanto a los genes pertenecientes a la familia de las DHNs, nuestros resultados indican que *PpDHNA* tiene mayor eficiencia en conferir tolerancia al estrés osmótico y salino que *PpDHNB*. Estos resultados provienen del análisis fenotípico de los mutantes *knockout* para cada uno de estos genes, así como de la sobreexpresión de los mismos en *A.thaliana*. Resulta interesante destacar que *PpDHNA* codifica para una DHN específica de musgos, siendo el ortólogo más cercano el gen *Tr288* de *Syntrichia ruralis*, un musgo de resurrección. Este gen codifica para una proteína que fue identificada en esta planta por ser la más abundante en el proceso de rehidratación de este musgo, luego de una deshidratación casi total (Velten y Oliver 2001). Nuestros resultados muestran que tanto *PpDHNA* como *PpDHNB* modifican su localización subcelular en condiciones de estrés, asociándose a estructuras membranosas, sugiriendo un rol protector de las estructuras macromoleculares de las células. Por otro lado, ensayos de actividad *in vitro* de *PpDHNA* mostraron que esta proteína fue capaz de inhibir, casi por completo, la desnaturalización, tanto térmica, como química de la lisozima. Estos resultados le atribuyen un rol tipo chaperona a esta proteína.

En el caso de *PpHsp16.4*, se pudo demostrar que esta proteína se localiza en el citosol formando acúmulos, probablemente representando formas oligoméricas de *PpHsp16.4*. Resulta interesante que estas estructuras se observen siempre en la cercanía de los cloroplastos, asociados a la cara externa de estos organelos. Esto abre la puerta a otro tipo de estudios en los que se podrá evaluar si estas proteínas cumplen algún rol en, por ejemplo, el transporte de proteínas hacia o desde el cloroplasto.

Finalmente, mucho trabajo queda por realizarse con respecto al estudio del gen *PpCOR413*. En particular, resta por entender qué tipo de función cumpliría la proteína

codificada por este gen en la respuesta a la luz. En ese sentido, mediante microscopía electrónica se observó que las plantas mutantes *cor413* exhiben una alteración en la estructura de los tilacoides presentes en cloroplastos de plantas expuestas a luz fuerte, sugiriendo que esta proteína podría tener un rol estructural en estos organelos. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir del perfil de expresión de los genes cloroplásticos que codifican para las proteínas D1 y la D2, muestran que el mutante está afectado en la inducción de estos genes, particularmente el que codifica para la proteína D2 (*PsbD*) en respuesta al ABA. Este resultado sugiere que PpCOR413 podría a su vez tener un rol de señalización en los cloroplastos, ABA dependiente.

Como perspectivas del estudio de las dehidrasas, en primer lugar se planea seguir con el análisis de la función chaperona de PpDHNA, y estudiar si PpDHNB también tiene esta función. Además, se estudiará el rol que cumple esta proteína en condiciones normales de crecimiento. En ese setido, se cuantificará la concentración de ROS y de calosa acumulada en la pared del mutante *dhnA*, con un estándar de 1,3- β -glucano (*Euglena gracilis*, Sigma-Aldrich), ya disponible en el Laboratorio. Se evaluarán parámetros que tengan que ver con la división celular y respuestas a distintas hormonas.

Para el estudio de PpHsp16.4, se planea estudiar mejor si los acúmulos visualizados mediante estudios de localización son debidos a la formación de oligómeros de la misma proteína. Se abordará el estudio de la función de esta proteína en relación con los cloroplastos, en primera instancia a través de ensayos de inmunoprecipitación, utilizando las plantas transgénicas estables de *P.patens* que contienen la fusión PpHsp16.4-Citrina, y anticuerpos anti-GFP.

Finalmente, las perspectivas para el trabajo con PpCOR413 son más extensas. En primera lugar, se repetirán los estudios de fotoquímica en distintas condiciones de estrés. Se determinará la concentración de ROS de las plantas mutadas y salvajes. Se medirán pigmentos fotosintéticos y se cuantificará la cantidad de Rubisco en diferentes intensidades de luz. Se evaluará el fenotipo del mutante en la oscuridad. Finalmente, se realizarán estudios de la estructura del aparato fotosintético de las plantas mutantes mediante geles de poliacrilamida Blue-Native de dos dimensiones. Estos permiten identificar complejos multiproteicos, mediante la corrida electroforética de proteínas de la membrana tilacoidal. En una segunda dimensión, estos complejos se subdividen para analizar sus componentes por Western Blot, utilizando en este caso anticuerpos anti-GFP, en plantas que contienen la fusión PpCOR413-Citrina (plantas transgénicas no mostradas en esta tesis). Además de ésto, se planea adquirir anticuerpos contra proteínas de los fotosistemas, como por ejemplo LHCI, D1, D2, entre otras.

Referencias

- Abercrombie JM, O' Meara BC, Moffatt AR, Williams JH. Developmental evolution of flowering plant pollen tube cell walls: callose synthase (CalS) gene expression patterns. *Evo. Devo.*, 2011; 2:14
- Ágoston BS, Kovács D, Tompa P, Perczel A. Full backbone assignment and dynamics of the intrinsically disordered dehydrin ERD14. *Biomolecular NMR Assignments*, 2011; 5:189-193.
- Alamillo J, Almoguera C, Bartels D, Jordano J. Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol Biol*, 1995; 29:1093-1099.
- Alboresi A, Gerotto C, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T. *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proc. of the Nat. Ac. of Sci. of USA*, 2010; 107:11128-11133.
- Allagulova CR, Gilamov FR, Shakirova FM, Vakhitov VA. The plant dehydrins: structure and functions. *Biochemistry (Moscow)*, 2003; 68:945-951.
- Allen GJ, Muir SR, Sanders D. Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both $InsP_3$ and cyclic ADP-ribose. *Science*, 1995; 268:735-737
- Allen JF. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992; 1098:275-335.
- Almoguera C, Coca MA, Jordano J. Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress. *Plant J*, 1993; 4:947-958.
- Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 1987; 24:324-331
- Anderson JV, Li QB, Haskell DW, Guy CL. Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70 kD heat-shock cognate gene and expression of 70-heat shock genes during cold acclimation. *Plant Physiol*, 1994; 104:1359-70.
- Antikainen M, Griffith M, Zhang J, Hon WC, Yang DSC, Pihakaski-Maunsbach K. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crown and roots by tissue printing. *Plant Physiol.*, 1996; 110:845-857
- Apse MP y Blumwald E. Engineering salt tolerance in plants. *Curr Opin Biotechnol.*, 2002; 13:146-150.
- Arnoux P, Morosinotto T, Saga G, Bassi R, Pignol D. A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 2009; 21:2036-2044.
- Arrigo AP. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol Chem*, 1998; 379(1):19-26
- Asada K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Edited by Foyer CH, Mullineaux PM. Florida: CRC Press, 1994; 77-104.
- Asghar R, Fenton RD, DeMason DA, Close TJ. Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleurone dehydrin. *Protoplasma*, 1994; 177:87-94

- Ashton NW y Cove DJ. Isolation and preliminary characterization of aux-otrophic and analog resistant mutants of moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics*, 1977; 154:87-95.
- Asselbergh B, De Vleeschauwer D, Hofte M. Global switches and fine tuning ABA modulates plant pathogen defense. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2008; 21:709-719.
- Bailey S, Horton P, Walters RG. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the relationship between photosynthetic function and chloroplast composition. *Planta*, 2004; 218:793-802.
- Bailey S, Walters RG, Jansson S, Horton P. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta*, 2001; 213:794-801.
- Baldwin AJ, Lioe H, Robinson CV, Kay LE, Benesch JL. α B-crystallin polydispersity is a consequence of unbiased quaternary dynamics. *Journal of Molecular Biology*, 2011; 413:297-309.
- Ballottari M, Dall'Osto L, Morosinotto T, Bassi R. Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282:8947-8958.
- Balsamo R, Boak M, Nagle K, Peethambaran B, Layton B. Leaf biomechanical properties in *Arabidopsis thaliana* polysaccharide mutants affect drought survival. *J. Biomech.*, 2015; S0021-9290 (15) 00564-3
- Baluska F, Samaj J, Wojtaszek P, Volkmann D, Menzel D. Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. *Emerging links revisited. Plant Physiol.*, 2003; 133(2):482-491.
- Banti V, Mafessoni F, Loreti E, Alpi A, Perata P. The Heat-Inducible Transcription Factor HsfA2 Enhances Anoxia Tolerance in *Arabidopsis*. *C*, 2010; 152(3):1471-1483
- Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazmaier M, Gagnon J, Triantaphylides C. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J*, 1998; 13:519-27.
- Basha E, Lee GJ, Demeler B, Vierling E: Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. *Eur J Biochem*, 2004; 271:1426-1436.
- Basha E, O'Neill H, Vierling E. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci*, 2012; 37:106-17.
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR. Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci.*, 2010; 15:330-336
- Benito B y Rodríguez-Navarro A. Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J*, 2003; 36:382-389.
- Bepperling A, Alte F, Kriehuber T, Braun N, Weinkauff S, Groll M, et al. Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109:20407-12.
- Bockaert J y Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.*, 1999; 18:1723-1729.
- Bohnert HJ y Sheveleva E. Plant stress adaptations making metabolism move. *Current*

Opinion in plant Biology, 1998; 1:267-274.

-Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 1995; 7:1099-1111.

-Bondino HG, Valle EM, Ten Have A. Evolution and functional diversification of the small heat shock protein alpha-crystallin family in higher plants. *Planta*, 2012; 235:1299-1313.

-Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV, Voinikov VK. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol.*, 2002; 2:5.

-Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Voinikov VK. Accumulation of proteins immunochemically related to dehydrins in mitochondria of plants exposed to low temperature. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2000; 371:46-49.

-Boston RS, Viitanen PV, Vierling E. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, 1996; 32:191-222.

-Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279:41758-41766.

-Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72:248-254.

-Brady S, Sarkar S, Bonetta D, McCourt P. The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 2003; 34:67-75.

-Bravo LA, Close TJ, Corcuera LJ, Guy CL. Characterization of an 80-kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 1999; 106:177-183.

-Bravo LA, Gallardo J, Navarrete A, Olave N, Martinez J, Alberdi M, et al. Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiol. Plant.*, 2003; 118:262-269.

-Bray EA. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.*, 1997; 2:48-54.

-Breton G, Danyluk J, Charron JB, Sarhan F. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispinning transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2003; 132(1):64-74.

-Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pages M, Masmoudi K. Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.*, 2007; 26:2017-2026.

-Browse J y Xin Z. Temperature sensing and cold acclimation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2001; 4:241-246.

-Bucher GL, Tarina C, Heinlein M, Di Serio F, Meins F, Jr, Iglesias VA. Local expression of enzymatically active class I β -1,3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *Plant J.*, 2001; 28:361-369.

-Buchner J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB Journal*, 1996; 10:10-19.

- Busk PK y Pages M. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol. Biol.*, 1998; 37:425-435.
- Busk PK, Jensen AB, Pages M. Regulatory elements in vivo in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *The Plant Journal*, 1997; 11:1285-1295.
- Campbell JL, Klueva NY, Zheng HG, Nieto-Sotelo J, Ho TD, Nguyen HT. Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene family in wheat (*Triticum aestivum* (L.) Moench) inducible by heat, dehydration, and ABA. *Biochim Biophys Acta*, 2001; 1517:270-7.
- Campion C, Massiot P, Rouxel F. Aggressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. *Eur. J. Plant Pathol.*, 1997; 103:725-735
- Chan-Schamnet KY, Baniwal SK, Bublak D, Nover L, Scharf KD. Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene. *J Biol Chem*, 2009; 284:20848-20857
- Chang PFL, Jinn TL, Huang WK, Chen Y, Chang HM, Wang CW. Induction of a cDNA clone from rice encoding a class II small heat shock protein by heat stress, mechanical injury, and salicylic acid. *Plant Sci*, 2007; 172:64-75.
- Checker VG, Chhibbar AK, Khurana P. Stress-inducible expression of barley *Hva1* gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress. *Transgenic Res.*, 2012; 21:939-957.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.*, 2007; 12:444-452.
- Clarke SM, Mur LAJ, Wood JE, Scott IM. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 2004; 38:432-447.
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM. Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science*, 2009; 323:95-101.
- Close TJ. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant.*, 1997; 100:291-296.
- Close TJ. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant*, 1996; 97:795-803.
- Clough SJ y Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998; 16:735-743.
- Coello P, Hey SJ, Halford NG. The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *J. Exp. Bot.*, 2011; 62:883-93.
- Colton-Gagnon K, Ali-Benali MA, Mayer BF, Dionne R, Bertrand A, Do Carmo S, Charron JB. Comparative analysis of the cold acclimation and freezing tolerance capacities of seven diploid *Brachypodium distachyon* accessions. *Annals of Botany*, 2014; 113:681-693.
- Conn PF, Schalch W, Truscott TG. The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 1991; 11:41-47.
- Crosatti C, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Cattivelli L. Harden the chloroplast to

- protect the plant. *Physiol. Plantarum*, 2013; 147:55-63.
- Cuming A, Cho SH, Kamisugi Y, Graham H, Quatrano RS. Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*, 2007; 176:275-287.
 - Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 2010; 61:651-679.
 - Dal Bosco C, Busconi M, Govoni C, Baldi P, Stanca AM, Crosatti C, et al. cor gene expression in barley mutants affected in chloroplast development and photosynthetic electron transport. *Plant Physiol.*, 2003; 131:793-802.
 - Dall'Osto L, Caffarri S, Bassi R. A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *Plant Cell*, 2005; 17:1217-1232.
 - Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F. Accumulation of an Acidic Dehydrin in the Vicinity of the Plasma Membrane during Cold Acclimation of Wheat. *The Plant Cell*, 1998; 10:623-638.
 - Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2005; 139:847-856
 - de Bianchi S, Ballottari M, Dall'Osto L, Bassi R. Regulation of plant light harvesting by thermal dissipation of excess energy. *Biochem. Soc. Trans.*, 2010; 38:651-660.
 - de Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JA: Genealogy of the alpha-crystallin–small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol*, 1998; 22:151–162.
 - de Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez Egea P, Bogre L, Grant M. *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J.*, 2007; 26:1434-1443.
 - Dellaporta S, Wood J, Hicks J. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1983; 1:19-21.
 - Demmig-Adams B, Adams WW, Barker DH, Logan BA, Bowling DR, Verhoeven AS. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 1996; 98:253-264.
 - Demmig-Adams B, Adams WW, Heber U, Neimanis S, Winter K, Krüger A, Czygan F-C, Bilger W, Björkman O. Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiology*, 1990; 92:293-301.
 - Demmig-Adams B, Muller O, Stewart JJ, Cohu CM, Adams III WW. Chloroplast thylakoid structure in evergreen leaves employing strong thermal energy dissipation. *J. Photochem. and Photobiol.*, 2015; article in press.
 - Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature*, 2003; 426:884-890.
 - Dosztanyi Z, Csizmok V, Tompa P, Simon I. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, 2005; 21:3433-3434.
 - Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K,

Yamaguchi-Shinozaki K. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal*, 2003; 33:751-763.

-Eberhard S, Finazzi G, Wollman FA. The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 2008; 42:463-515.

-Egerton-Warburton LM, Balsamo RA, Close TJ. Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays* L. *Physiol Plant*, 1997; 101:545-555.

-Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, Buchner J. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J*, 1997; 16:221-229.

-Eriksson SK, Kutzer M, Procek J, Grobner G, Harryson P. Tunable membrane binding of the intrinsically disordered dehydrin Iti30, a cold-induced plant stress protein. *Plant Cell*, 2011; 23:2391-2404.

-Esser JE, Liao YJ, Schroeder JI. Characterization of ion channel modulator effects on ABA- and malate-induced stomatal movements: Strong regulation by kinase and phosphatase inhibitors, and relative insensitivity to mastoparans. *J. Exp. Bot*, 1997; 48:539-550.

-Evrard A, Kumar M, Lecourieux D, Lucks J, von Koskull-Döring P, Hirt H. Regulation of the heat stress response in *Arabidopsis* by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ*, 2013; 1:59

-Eyles SJ y Gierasch LM. Nature's molecular sponges: small heat shock proteins grow into their chaperone roles. *Proc. Nat. Ac. Sci., USA*, 2010; 107:2727-2728.

-Finkelstein R y Lynch T. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 2000; 12:599-609.

-Finkelstein RR, Gampala SL, Rock CD. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 2002; S15-S45.

-Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell*, 1998; 10:1043-1054.

-Finkelstein RR. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J.*, 1994; 5:765-771.

-Flors V, Ton J, Jakab G, Mauch-Mani B. Abscisic acid and callose: Team players in defence against pathogens? *J. Phytopathol.*, 2005; 153:377-383.

-Forreiter C, Kirschner M, Nover L. Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo. *Plant Cell*, 1997; 9:2171-2181

-Forster B, Pogson BJ, Osmond CB. Lutein from deepoxidation of lutein epoxide replaces zeaxanthin to sustain an enhanced capacity for nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in avocado shade leaves in the dark. *Plant Physiology*, 2011; 156:393-403.

-Foyer CH y Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 2005; 17:1866-1875

-Frank W, Ratnadewi D, Reski R. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*, 2005; 220(3):284-394.

- Fu X, Shi X, Yan L, Zhang H, Chang Z. In vivo substrate diversity and preference of small heat shock protein IbpB as revealed by using a genetically incorporated photo-cross-linker. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288:31646-31654.
- Fu X. Chaperone function and mechanism of small heat-shock proteins. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2014; 46:347-356.
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK. Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proc. Nat. Ac. Sci., USA.*, 2011; 108:1717-1722.
- Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 2011; 124:509-525.
- Gaff DF. Desiccation tolerant vascular plants of southern Africa. *Oecologia*, 1997; 31:95-109.
- Garab G. Structural changes and non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in oxygenic photosynthetic organisms. In *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria, Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 40, 2014; 343-371.
- Garwe D, Thomson JA, Mundree SG. Molecular characterization of XVSAP1, a stress-responsive gene from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. *J. Exp. Bot.*, 2003; 54(381):191-201.
- Garwe D, Thomson JA, Mundree SG. XVSAP1 from *Xerophyta viscosa* improves osmotic-, salinity- and high-temperature-stress tolerance in *Arabidopsis*. *Biotechnol. J.*, 2006; 1(10):1137-46.
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989; 990:87-92.
- Gerotto C, Alboresi A, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T. Role of PSBS and LHCSR in *Physcomitrella patens* acclimation to high light and low temperature. *Plant Cell and Environment*, 2011; 34:922-932.
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM. Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell*, 1992; 4:1251-1261.
- Godoy JA, Lunar R, Torresschumann S, Moreno J, Rodrigo RM, Pintorero JA. Expression, tissue distribution and subcellular-localization of dehydrin Tas14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol. Biol.*, 1994; 26:1921-1934.
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb A, Vartanian N, Giraudat J. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 1999; 11:1897-1909.
- Goyal K, Walton LJ, Browne JA, Burnell AM, Tunnacliffe A. Molecular anhydrobiology: identifying molecules implicated in invertebrate anhydrobiosis. *Integrative & Comparative Biology*, 2005; 45:702-709.

- Grabov A, Leung J, Giraudat J, Blatt MR. Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant J*, 1997; 12:203-213.
- Griffith M y Yaish MWF. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci.*, 2004; 9:399-405
- Griffith M, Ala P, Yang DSC, Hon WC, Moffat B. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol.*, 1992; 100:593-596
- Guiltinan MJ, Marcotte WR, Quatrano RS. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*, 1990; 250:267-271.
- Gurley WB. HSP101: a key component for the acquisition of thermotolerance in plants. *Plant Cell*, 2000; 12:457-459.
- Hamilton EW y Heckathorn SA. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol.*, 2001; 126:1266-1274.
- Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance
- Hao GP, Wu ZY, Chen MS, Cao MQ, Pelletier G, Huang CL, Yang Q. ATHK1 gene regulates signal transduction of osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao*, 2004; 30(5):553-560.
- Hara M, Terashima S, Kuboi T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J. Plant. Physiol.*, 2001; 158:1333-1339.
- Hara M, Terashima TF, Fukaya T, Kuboi T. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 2003; 217:290-298.
- Haralampidis K, Milioni D, Rigas S, Hatzopoulos P. Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the *Arabidopsis AtHsp90-1* gene. *Plant Physiol*, 2002; 129:1138-49.
- Hardie DG. Plant protein serine/threonine kinases: Classification and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.*, 1999; 50:97-131.
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF. CDPKs: A kinase for every Ca^{2+} signal?. *Trends Plant Sci*, 2000; 5:154-159.
- Harndahl U, Hall RB, Osteryoung KW, Vierling E, Bornman JF, Sundby C. The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress Chaperon*, 1999; 4:129-138.
- Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996; 381:571-580.
- Haslbeck M, Braun N, Stromer T, Richter B, Model N, Weinkauff S, et al. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 2004; 23:638-49.
- Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurtner D, Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2005; 12:842-846.
- Havaux M, Dall'Osto L, Bassi R. Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of

binding to PSII antennae. *Plant Physiology*, 2007; 145:1506-1520.

-Heckathorn SA, Downs CA, Coleman JS. Nuclear encoded chloroplast proteins accumulate in the cytosol during severe heat stress. *Int. J. Plant Sci.*, 1998; 159:39-45.

-Heikal AA, Hess ST, Baird GS, Tsien RY, Webb WW. Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:11996-12001.

-Hey SJ, Bacon A, Burnett E, Neill SJ. Abscisic acid signal transduction in epidermal cells of *Pisum sativum* L. Argenteum: Both dehydrin mRNA accumulation and stomatal responses require protein phosphorylation. *Planta*, 1997; 202:85-92.

-Heyen BJ, Alsheikh MK, Smith EA, Torvik CF, Seals DF, Randall SK. The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol.*, 2002; 130:675-687.

-Hilario E, Martin FJ, Bertolini MC, Fan L. Crystal structures of Xanthomonas small heat shock protein provide a structural basis for an active molecular chaperone oligomer. *J. Mol. Biol.*, 2011; 408:74-86.

-Hilton GR, Lioe H, Stengel F, Baldwin AJ, Benesch JLP. Small heat-shock proteins: paramedics of the cell. *Top Curr Chem*, 2013; 328:69-98.

-Himmelbach A, Yang Y, Grill E. Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2003; 6:470-479.

-Hoekstra FA, Golosina EA and Buitink J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.*, 2001; 6:431-449.

-Holappa LD y Walker-Simmons MK. The wheat abscisic acid-regulated protein kinase mRNA, PKABA1, is up-regulated by dehydration, cold temperature, and osmotic stress. *Plant Physiol.*, 1995; 108:1203-1210.

-Hong SW y Vierling E. Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.*, 2001; 27:25-35.

-Hong SW y Vierling E. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97:4392-4397.

-Hong SW, Jon JH, Kwak JM, Nam HG. Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 1997; 113:1203-1212.

-Horie T, Hauser F, Schroeder JI. HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends in Plant Science*, 2009; 14:660-668

-Horton P, Ruban AV, Walters RG. Regulation of light harvesting in green plants. *An. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1996; 47:655-684.

-Horton P. Developments in research on non-photochemical fluorescence quenching: emergence of key ideas, theories and experimental approaches. In: *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*, Volume 40 of the series *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 2014; 73-95.

-Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberte's, Sarhan F. Immunolocalization of freezing-tolerance associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown

tissue. *Plant J.*, 1995; 8:583-593

-Howarth C. Heat shock proteins in *Sorghum bicolor* and *Pennisetum americanum*. II. Stored RNA in sorghum seed and its relationship to heat shock protein synthesis during germination. *Plant Cell Environ.*, 1990; 13:57-64

-Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, et al. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.*, 2003; 132:666-80.

-Hu L, Wang Z, Du H, Huang B. Differential accumulation of dehydrins in response to water stress for hybrid and common bermudagrass genotypes differing in drought tolerance. *J. Plant Physiol.*, 2010; 167:103-109.

-Huang Q, Wang Y, Li B, Chang J, Chen M, Li K, Yang G, He G. TaNAC29, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis. *BMC Plant Biol.*, 2015; 15:268-282

-Hughes MA y Dunn MA. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J Exp. Bot.*, 1996; 47:291-305.

-Hughes S y Graether SP. Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein. *Protein Science*, 2010; 20:42-50.

-Huner NPA, Oquist G, Sarhan F. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science*, 1998; 3:224-230.

-Iglesias VA y Meins F. Movement of plant viruses is delayed in a β -1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *Plant J.*, 2000; 21:157-166.

-Ingram J y Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1996; 47:377-403.

-Ismail AM, Hall AE, Close TJ. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol.*, 1999; 120:237-244.

-Iturriaga G, Schneider K, Salamini F, Bartels D. Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 1002; 20:555-558.

-Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, Fincher GB. An Arabidopsis callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. *Plant Cell.*, 2003; 15:2503-2513.

-Jahns P y Holzwarth AR. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012; 1817:182-193.

-Jahns P, Latowski D, Strzalka K. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Bioch. Biophysica Acta*, 2009; 1787:3-14.

-Jensen AB, Goday A, Figueras M, Jessop AC, Pages M. Phosphorylation mediates the nuclear targeting of the maize Rab17 protein. *Plant J.*, 1998; 13:691-697.

-Jiang Y y Huang B. Protein alterations in response to water stress and ABA in Tall fescue. *Crop Sci.*, 2002; 42:202-207.

-Johnson GN. Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1807:384-389.

- Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK. The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol.*, 2002; 130(2):837-846.
- Kacperska A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity?. *Physiologia Plantarum*, 2004; 122:159-168.
- Kaliff M, Staal J, Myrenas M, Dixelius C. ABA is required for *Leptosphaeria maculans* resistance via ABI1- and ABI4-dependent signaling. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2007; 20:335-345.
- Kamisugi Y, Schlink K, Rensing SA, Schween G, von Stackelberg M, Cuming AC, Reski R, Cove DJ. The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic Acids Res*, 2006; 34:6205-6214.
- Kamisugi Y y Cuming AC. The evolution of the abscisic acid-response in land plants: comparative analysis of Group 1 LEA gene expression in moss and cereals. *Plant Mol. Biol.*, 2005; 59:723-737.
- Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A, Zhu JK, Staskawicz BJ, Jin HL. A pathogen- inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc. Nat. Ac. Sci., USA*, 2006; 103:18002-18007.
- Kawamura Y y Uemura M. Changes in the plasma membrane from *Arabidopsis thaliana* within one week of cold acclimation. In: P. Li and E.T. Palva (Eds.), *Plant Cold Hardiness; Gene Regulation and Genetic Engineering*, Klu- wer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002; 181-194.
- Kawamura Y y Uemura M. Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *Plant J.*, 2003; 36:141-154.
- Kaye C, Neven L, Hofig A, Li QB, Haskell D, Guy C. Characterization of a gene for spinach CAP160 and expression of two spinach cold-acclimation proteins in tobacco. *Plant Physiol.*, 1998; 116:1367-1377.
- Kazuoka T y Oeda K. Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold acclimated spinach. *Plant Cell Physiol.*, 1994; 35:601-611.
- Khandelwal A, Cho SH, Marella H, Sakata Y, Perroud PF, Pan A, Quatrano RS. Role of ABA and ABI3 in desiccation tolerance. *Science*, 2010; 327:546
- Khokhlova VA, Karavaiko NN, Podergina TA, Kulaeva ON. The antagonistic effect of abscisic acid and cytokinin on the structural and biochemical differentiation of chloroplasts in isolated pumpkin cotyledons. *Cell and Tissue Biology (Tsitologija)*, 1978; 20:1033-1039.
- Kim DH, Xu ZY, Na YJ, Yoo YJ, Lee J, Sohn EJ, Hwang I. Small heat shock protein Hsp17.8 functions as an AKR2A cofactor in the targeting of chloroplast outer membrane proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2011; 157:132-146.
- Kirchhoff H, Sharpe RM, Herbstová M, Yarbrough R, Edwards GE. Differential mobility of pigment-protein complexes in granal and agranal thylakoid membranes of C3 and C4

- plants. *Plant Physiol.*, 2013; 161:497-507.
- Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Characterization of a cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a ClpA, B-like protein in *Arabidopsis thaliana* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993; 196:1214-1220.
- Kizis D y Pages M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *The Plant Journal*, 2002; 30:679-689.
- Knight CD, Sehgal A, Atwal K, Wallace JC, Cove DJ, Coates D, Quatrano RS, Bahadur S, Stockley PG, Cuming AC. Molecular responses to abscisic acid and stress are conserved between moss and cereals. *Plant Cell*, 1995; 7:499-506.
- Koag MC, Fenton RD, Wilkens S, Close TJ. The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiol.*, 2003; 131:309-316.
- Koag MC, Wilkens S, Fenton RD, Resnik J, Vo E, Close TJ. The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiol.*, 2009; 150:1503-1514.
- Kobayashi N y Della Penna D. Tocopherol metabolism, oxidation and recycling under high light stress in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 2008; 55:607-618.
- Komatsu K, Nishikawa Y, Ohtsuka T, Taji T, Quatrano RS, Tanaka S, Sakata Y. Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between *Arabidopsis* and the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol.*, 2009; 70:327-340
- Kosová K, Vítámvás P, Prášílová P, Prášil IT. Accumulation of WCS120 and DHN5 proteins in differently frost-tolerant wheat and barley cultivars grown under a broad temperature scale. *Biol. Plant.*, 2013; 57:105-112.
- Koster KL, Balsamo RA, Espinoza C, Oliver MJ. Desiccation sensitivity and tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: assessing limits and damage. *Plant Growth Regulation*, 2010; 62:293-302.
- Kotak S, Vierling E, Baumlein H, von Koskull-Doring P. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007; 19:182-195-
- Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, Tompa P. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology*, 2008; 147:381-390.
- Krasensky J, Jonak C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.*, 2012; 63:1593-1608.
- Krause GH y Jahns P. Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration*, 2004; 19:463-495.
- Kuhn JM y Schroeder JI. Impacts of altered RNA metabolism on abscisic acid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2003; 6(5):463-9.
- Kusnetsov V, Herrmann RG, Kulaeva ON, Oelmüller R. Cytokinin stimulates and abscisic acid inhibits greening of etiolated *Lupinus luteus* cotyledons by affecting the expression of

the light-sensitive protochlorophyllide oxidoreductase. *Molecular Genetics and Genomics*, 1998; 259:21-28.

-Labhili M, Joudrier P, Gautier MF. Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Sci.*, 1995; 112:219-230.

-Lang V y Palva ET. The expression of a rab-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold-acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.*, 1992; 20:951-962.

-Larkindale J y Huang B. Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *J. Plant. Physiol.*, 2004; 161:405-413.

-Larkindale J y Vierling E. Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiol.*, 2008; 146:748-761.

-Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.*, 2005; 138:882-897.

-Layton BE, Boyd MB, Tripepi MS, Bitonti BM, Dollahon MN, Balsamo RA. Dehydration-induced expression of a 31-kDa dehydrin in *Polypodium polypodioides* (Polypodiaceae) may enable large, reversible deformation of cell walls. *American Journal of Botany*, 2010; 97:535-544.

-Lee BH, Won SH, Lee HS, Miyao M, Chung WI, Kim IJ, et al. Expression of the chloroplast localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. *Gene*, 2000; 245:283-90.

-Lee GJ y Vierling E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol*, 2000; 122:189–198.

-Lee GJ, Pokala N, Vierling E. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biological Chemistry*, 1995; 270:10432-10438.

-Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J*, 1997; 16:659-671.

-Leung J y Giraudat J. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998; 49:199-222.

-Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Chefdor F, Giraudat J. *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: Features of a calcium modulated phosphatase. *Science*, 1994; 264:1448-1454.

-Leung J, Merlot S, Giraudat J. The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 2 (ABI2)* and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, 1997; 9:759-771.

-Li J, Wang XQ, Watson MB, Assmann SM. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science*, 2000; 287:300-303.

-Liberek K, Lewandowska A, Zietkiewicz S. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO Journal*, 2008; 27:328-335.

- Lichtenthaler HK y Becker K. Inhibition of the light-induced vitamin K1 and pigment synthesis by abscisic acid. *Phytochemistry*, 1970; 9:2109-2113.
- Lisse T, Bartels D, Kalbitzer HR, Jaenicke R. The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three- dimensional structure in its native state. *Biol. Chem.*, 1996; 377:555-567.
- Liu D, Zhang X, Cheng Y, Takano T, Liu S. rHsp90 gene expression in response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol Biochem*, 2006; 44:380-386.
- Liu HC, Liao HT, Charng YY. The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, 2011; 34:738-751
- Liu J y Zhu J-K. An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* , 2011; 94:14960-14964.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998; 10:1391-1406.
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu WH, Ma L. A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science*, 2007; 315:1712-1716.
- Löw D, Brandle K, Nover L, Forreiter C. Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. *Planta*, 2000; 211:575–582.
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Grissem W. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*, 2002; 14:S389-S400.
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J. Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *MPMI*, 2011; 24(2):183-193.
- Lunde C, Drew DP, Jacobs AK, Tester M. Exclusion of Na⁺ via Sodium ATPase (PpENA1) Ensures Normal Growth of *Physcomitrella patens* under Moderate Salt Stress. *Plant Physiology*, 2007; 144:1786-1796
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 2009; 324:1064-1068.
- Malik MK, Slovin JP, Hwang CH and Zimmerman JL. Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, HSP17.7, results in increased or decreased thermotolerance. *Plant J.*, 1999; 20:1-11.
- Marella HH, Sakata Y, Quatrano RS. Characterization and functional analysis of ABSCISIC ACID INSENSITIVE3-like genes from *Physcomitrella patens*. *Plant J.*, 2006; 46:1032-1044.
- Marentes E, Griffith M, Mlynarz A, Brush RE. Proteins accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation. *Physiol Plant*, 1993; 87:499-507
- Martin F. Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. *Pythium*. In: Komoto K, Singh US, Singh RP (eds) Pergamon Press, Oxford, 1994; 17-36
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Identification of cold-inducible downstream genes of

the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*, 2004; 38:982-993.

-Mäser P, Eckelman B, Vaidyanathan R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M, Yamagami M, Yamaguchi K, Nishimura M, Uozumi N, Robertson W, Sussman MR, Schroeder JI. Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in Arabidopsis by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Letters*, 2002a; 531(2):157-161.

-Mäser P, Hosoo Y, Goshima S, Horie T, Eckelman B, Yamada K, Yoshida K, Bakker EP, Shinmyo A, Oiki S, Schroeder JI, Uozumi N. Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *Proc. Nat. Ac. Sci., USA*, 2002b; 99(9):6428-6433.

-Mauch-Mani B y Mauch F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2005; 8:409-414.

-Mayhew M y Hartl FU. Lord of the rings: GroES structure. *Science*, 1996; 12:161-162.

-McCarty DR, Hattori T, Carson CB, Vasil V, Lazar M, Vasil IK. The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell*, 1991; 66:895-905.

-McCormick S. Male gametophyte development. *Plant Cell.*, 1993; 5:1265-1275.

-McCourt P y Creelman R. The ABA receptors: we report you decide. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2008; 11:474-478.

-McHaourab HS, Godar JA, Stewart PL. Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry*, 2009; 48:3828-3837.

-Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J, Peterson FC, Jensen DR, Yong EL, Volkman BF, Cutler SR, Zhu JK, Xu HE. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature*, 2009; 462:602-608.

-Melis A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991; 1058:87-106.

-Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 2006; 126:969-980.

-Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends in Bioch. Sci.*, 1995; 20:506-510.

-Meyer K, Leube MP, Grill E. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Science*, 1994; 264:1452-1455.

-Miernyk JA. The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *Trends Plant Sci.*, 1997; 2:80-87.

-Miller G y Mittler R. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants?. *Ann. Bot. (Lond)*, 2006; 98:279-288.

-Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.*, 2010; 33:453-467.

-Minami A, Nagao M, Arakawa K, Fujikawa S, Takezawa D. Abscisic acid-induced freezing

tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *J. Plant Physiol.*, 2003; 160(5):475-483.

-Minami A, Nagao M, Ikegami K, Koshihara T, Arakawa K, Fujikawa S, Takezawa D. Cold acclimation in bryophytes: low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid. *Planta*, 2005; 220:414-423

-Mishra SK, Tripp J, Winkelhaus S, Tschiersch B, Theres K, Nover L, Scharf K-D. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes & Development*, 2002; 16(12):1555-1567.

-Mittler R, Finka A, Goloubinoff P. How do plants feel the heat? *Trends Biochem. Sci.*, 2012; 37(3):118-125.

-Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua N-H. Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87:406-410.

-Munns R y Tester M. Mechanism of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008; 59:651-681.

-Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J. Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell*, 2002; 14:3089-3099.

-Nagao M, Minami A, Arakawa K, Fujikawa S, Takezawa D. Rapid degradation of starch in chloroplasts and concomitant accumulation of soluble sugars associated with ABA-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *J Plant Physiol.*, 2005; 162:169-180.

-Nakamoto H y Vigh L. The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci*, 2007; 64:294-306.

-Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol.*, 2009; 149:88-95.

-Nambara E y Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 2005; 56:165-185.

-Nambara E, Hayama R, Tsuchiya Y, Nishimura M, Kawaide H, Kamiya Y, Naito S. The role of ABI3 and FUS3 loci in *Arabidopsis thaliana* on phase transition from late embryo development to germination. *Dev. Biol.*, 2000; 220:412-423.

-Nambara E, Keith K, McCourt P, Naito S. A regulatory role for the ABI3 gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 1995; 121:629-636.

-Nambara E, Keith K, McCourt P, Naito S. Isolation of an internal deletion mutant of the *Arabidopsis thaliana* ABI3 gene. *Plant Cell Physiol.*, 1994; 35:509-513.

-Neuhaus JM y Boevink P. The green fluorescent protein (GFP) as a reporter in plant cells. In *Plant Cell Biology*. Edited by Hawes C, Satiat-Jeunemaitre B. Oxford, UK: Oxford University Press, 2001; 127-142.

-Nichol CJ, Pieruschka R, Takayama K, Forster B, Kolber Z, Rascher U, Grace J, Robinson SA, Pogson B, Osmond B. Canopy conundrums: building on the Biosphere 2 experience to scale measurements of inner and outer canopy photoprotection from the leaf to the

- landscape. *Functional Plant Biology*, 2012; 39:1-24.
- Nilkens M, Kress E, Lambrev P, Miloslavina Y, Muller M, Holzwarth AR, Jahns P. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010; 1797:466-475.
 - Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S. *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J.*, 2006; 48:535-547.
 - Niyogi KK, Grossman AR, Björkman O. *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell*, 1998; 10:1121-1134.
 - Niyogi KK. Safety valves for photosynthesis. *Curr. Op. Plant Biol.*, 2000; 3:455-460.
 - Nover L, Scharf KD, Neumann D. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell Biol.*, 1989; 9:1298-1308.
 - Nylander M, Heino P, Helenius E, Palva ET, Ronne H, Welin BV. The low-temperature- and salt-induced RCI2A gene of *Arabidopsis* complements the sodium sensitivity caused by a deletion of the homologous yeast gene SNA1. *Plant Mol. Biol.*, 2001; 45:341-352.
 - Okawa K, Nakayama K, Kakizaki T, Yamashita T, Iinaba T. Identification and characterization of Cor413im proteins as novel components of the chloroplast inner envelope. *Plant, Cell and Environment*, 2008; 31:1470-1483
 - Oldenhof H, Wolkers WF, Bowman JL, Tablin F, Crowe JH. Freezing and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: an in situ Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006; 1760:1226-1234.
 - Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Cascón T, Schmelz EA, Castresana C, Ponce de León I. *Pythium* infection activates conserved plant defense responses in mosses. *Planta*, 2009; 230(3):569-579.
 - Pandey S y Assmann SA. The *Arabidopsis* putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein a subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 2004; 16:1616-1632.
 - Pandey S, Nelson DC, Assmann SM. Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell*, 2009; 136:136-148.
 - Papageorgiou G y Murata N. The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosyn. Res*, 1995; 44:243-252.
 - Papdi C, Ábrahám E, Prathiba Joseph M, Popescu C, Koncz C, Szabados L. Functional identification of *Arabidopsis* stress regulatory genes using the Controlled cDNA Overexpression System, COS. *Plant Physiology Preview*, 2008; 10.1104:108-116.
 - Parcy F, Valon C, Kohara A, Misera S, Giraudat J. The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3, FUSCA3, and LEAFY COTY LEDON1 loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *Plant Cell*, 1997; 9:1265-1277.
 - Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, Giraudat, J. Regulation of

gene expression programs during Arabidopsis seed development: Roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell*, 1994; 6:1567-1582.

-Park EJ, Jeknic Z, Sakamoto A, Denoma J, Yuwansiri R, Murata N, Chen TH. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *Plant J.*, 2004; 40:474-487.

-Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkenstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/ PYL family of START proteins. *Science*, 2009; 324:1068-1071

-Peers G, Truong TB, Ostendorf E, Busch A, Elrad D, Grossman AR, Hippler M, Niyogi KK. An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature*, 2009; 462:518-521.

-Pei ZM, Ghassemian M, Kwak CM, McCourt P, Schroeder JI. Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in Arabidopsis wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell*, 1997; 9:409-423.

-Pelham HR. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell*, 1982; 30:517-528

-Peschek J, Braun N, Rohrberg J, Back KC, Kriehuber T, Kastenmuller A, et al. Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of alphaB-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013;110:E3780-3789.

-Pla M, Huguet G, Verdaguer D, Puigderrajols P, Llompart B, Nadal A, Molinas M. *Plant Sci.*, 1998; 139:49-57.

-Plana M, Itarte E, Eritja R, Goday A, Page´s M, Martínez MC. Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266:22510-22514.

-Polge C y Thomas M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control?. *Trends Plant Sci*, 2007; 12:20-28.

-Ponce de Leon I, Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Bentancor M, Vidal S. *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*, 2007; 7:52.

-Porembski S y Barthlott W. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation tolerant plants. *Plant Ecology*, 2000; 151:19-28.

-Powles SB. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1984; 35:15-44.

-Prandl R, Kloske E, Schoffl F. Developmental regulation and tissue-specific differences of heat-shock gene-expression in transgenic tobacco and Arabidopsis plants. *Plant. Mol. Biol.*, 1995; 28:73-82.

-Pucciariello C, Banti V, Perata P. ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses. *Plant Physiol. Biochem.*, 2012; 59:3-10

-Puhakainen T, Hess MW, Makela P, Svensson J, Heino P, Palva ET. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.*, 2004; 54:743-753.

- Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2002; 99:8436-8441.
- Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK. Regulation of vacuolar Na/H exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279:207-215
- Queitsch C, Hong SW, Vierling E and Lindquist S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2000; 12:479-492.
- Quintero FJ, Martinez-Atienza J, Villalta I, Jiang X, Kim WY, Ali Z, Fujii H, Mendoza I, Yun DJ, Zhu JK, Pardo JM. Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2011; 108(6):2611-2616
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD. The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature*, 2006; 439:290-294.
- Reddy GB, Das KP, Petrash JM, Surewicz WK. Temperature-dependent chaperone activity and structural properties of human alphaA- and alphaB-crystallins. *J Biol Chem*, 2000; 275:4565-4570.
- Reddy RK, Chaudhary S, Patil P, Krishna P. The 90 kDa heat shock protein (hsp90) is expressed throughout *Brassica napus* seed development and germination. *Plant Sci*, 1998; 131:131-7.
- Reinhold C, Niczyporuk S, Beran KC, Jahns P. Short-term down-regulation of zeaxanthin epoxidation in *Arabidopsis thaliana* in response to photo-oxidative stress conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008; 1777:462-469.
- Renaut J, Hausman JF, Wisniewski ME. Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiol Plant*, 2006; 126:97-109.
- Rensing SA et al. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science Exp.*, 2007; 101126:1-7.
- Rensing SA, Kiessling J, Reski R, Decker EL. Diversification of *ftsZ* during early land plant evolution. *J. Mol. Evol.*, 2004; 58:154-162.
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, et al. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*, 2008; 319:64-69.
- Reski R. Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta*, 1999; 208:301-309.
- Reyes JL, Campos F, Wei H, Arora R, Yang Y, Karlson DT, Covarrubias AA. Functional dissection of hydrophilins during *in vitro* freeze protection. *Plant Cell Environ.*, 2008; 31:1781-90.
- Reyes JL, Rodrigo MJ, Colmenero-Flores JM, Gil JV, Garay-Arroyo A, Campos F, et al. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects *in vitro*. *Plant Cell Environ.*, 2005; 28:709-718.
- Richmond TA, Somerville CR. The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiol.*, 2000; 124:495-498.
- Rinne PLH, Kaikuranta PLM, van der Plas LHW, van der Schoot C. Dehydrins in cold-

acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta*, 1999; 209:377-388.

-Roberts JK, DeSimone NA, Lingle WL, Dure L. Cellular Concentrations and Uniformity of Cell-Type Accumulation of Two Lea Proteins in Cotton Embryos. *Plant Cell*, 1993; 7:769-780.

-Rock C. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.*, 2000; 148:357-396.

-Rodriguez PL. Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 1998; 38(6):919-927.

-Rohde A, Kurup S, Holdsworth M. ABI3 emerges from the seed. *Trends Plant Sci.*, 2000; 5:418-419.

-Romero P, Obradovic Z, Dunker AK. Natively disordered proteins: functions and predictions, *Appl Bioinformatics*, 2004; 3:105-113.

-Rontein D, Basset G, Hanson AD. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab Eng.*, 2002; 4:49-56.

-Rorat T, Grygorowicz WJ, Irzykowski W, Rey P. Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta*, 2004; 218:878-885

-Rorat T, Szabala BM, Grygorowicz WJ, Wojtowicz B, Yin Z, Rey P. Expression of SK3-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta*, 2006; 224:205-221.

-Ruibal C, Castro A, Carballo V, Szabados L, Vidal S. Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrella patens* requires a functional small heat shock protein PpHSP16.4. *BMC Plant Biology*, 2013; 13:174-191.

-Ruibal C, Pérez I, Carballo V, Castro A, Bentancor M, Borsani O, Szabados L and Vidal S. Individual dehydrin genes from *Physcomitrella patens* contribute differently to salt and osmotic stress tolerance in plants. *Plant Science*, 2012, 190:89-102.

-Ruibal C. Aislamiento, clonado y expresión de una dehidrina (DHNB) de *Physcomitrella patens*. Trabajo especial II, Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2006.

-Rumeau D, Peltier G, Cournac L. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ.*, 2007; 30:1041-1051.

-Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Welin B and Vidal S. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant J.*, 2006; 45: 237-249

-Sabehat A, Lurie S, Weiss D. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. A possible role in protecting against chilling injuries. *Plant Physiol*, 1998; 117:651-658.

-Saibil HR. Chaperone machines in action. *Current Opinion in Structural Biology*, 2008; 18:35-42.

-Saidi Y, Domini M, Choy F, Zryd JP, Schwitzguebel JP, Goloubinoff P. Activation of the heat shock response in plants by chlorophenols: transgenic *Physcomitrella patens* as a

- sensitive biosensor for organic pollutants. *Plant Cell Environ.*, 2007; 30:753-763.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi- Shinozaki K. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103:18822-18827
 - Saleh A, Lumreras V, Pages M. Functional role of DRE-binding transcription factors in abiotic stress. In: Tuberosa R, Phillips RL, Gale M, eds. *Proceedings of the International Congress 'In the Wake of the Double Helix From the Green Revolution to the Gene Revolution'*, 2005.
 - Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TA. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 - Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, 2002; 14:S401-S417.
 - Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park SY, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL, Marquez JA. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*, 2009; 462:665-668.
 - Santoni V, Rouquie D, Doumas P, Mansion M, Boutry M, Degand H, Dupree P, Packman L, Sherrier J, Prime T, Bauw G, Posada E, Rouze P, Dehais P, Sahnoun I, Barlier I, Rossignol M. Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *Plant Journal*, 1998; 16:633-641.
 - Schachtman DP y Schroeder JI. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, 1994; 370:655-658
 - Schaefer DG y Zryd JP. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.*, 1997; 11(6):1195-1206.
 - Schaefer DG, Zryd JP, Knigh CD. Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet*, 1991; 226:418-424.
 - Schaefer DG. Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr Opin Plant Biol*, 2001; 4:143-150
 - Scharf KD, Berberich T, Ebersberger I, Nover L. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012; 1819:104-119.
 - Scharf KD, Siddique M, Vierling E. The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress Chaperon*, 2001; 6:225-237.
 - Schmidt C, Schelle I, Liao YJ, Schroeder JI. Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92:9535-9539.
 - Schneider K, Wells B, Schmelzer E, Salamini F y Bartels D. Desiccation Leads to the Rapid Accumulation of Both Cytosolic and Chloroplastic Proteins in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*. *Hochst. Planta*, 1993; 189(1):120-131.
 - Schoffl F, Prandl R, Reindl A. Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiology*, 1998; 117:1135-1141.
 - Schuette S, Wood AJ, Geisler M, Geisler-Lee J, Ligrone R, Renzaglia KS. Novel localization

of callose in the spores of *Physcomitrella patens* and phylogenomics of the callose synthase gene family. *Annals of Botany*, 2009; 103:749-756.

-Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science*. 2004; 9:236-243.

-Scott AC y Glasspool IJ. The diversification of Paleozoic fire systems and fluctuations in atmospheric oxygen concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2006; 103:10861-10865.

-Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr Opin Biotechnol.*, 2003; 14:194-199.

-Sheen J. Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95:975-980.

-Shekhawat UK, Srinivas L, Ganapathi TR. MusaDHN-1, a novel multiple stress-inducible SK(3)-type dehydrin gene, contributes affirmatively to drought- and salt-stress tolerance in banana. *Planta*, 2011; 234:915-932.

-Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology*, 1997; 113(4):1177-1183.

-Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH, Zhang DP. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*, 2006; 443:823-826.

-Shi CC, Feng CC, Yang MM, Li JL, Li XX, Zhao BC, Huang ZJ, Ge RC. Overexpression of the receptor-like protein kinase genes *AtRPK1* and *OsRPK1* reduces the salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.*, 2014; 217-218.

-Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu J-K. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na/H antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97:6896-6901.

-Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter *SOS1* controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell*, 2002; 14(2):465-477

-Shim D, Hwang JU, Lee J, Lee S, Choi Y, An G, Martinoia E, Lee Y. Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor *HsfA4a* confer cadmium tolerance in wheat and rice. *Plant Cell*, 2009; 21:4031-4043

-Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.*, 1997; 115:327-334.

-Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 2007; 58:221-227.

-Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000; 3:217-223.

-Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Liu Q, et al. Molecular responses to drought stress in plants: regulation of gene expression and signal transduction. In: Smallwood MF, Calvert CM, Bowles DJ, eds. *Plant responses to environmental stress*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1999; 133-143.

-Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. Regulatory network of gene expression in

the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol.*, 2003; 6:410-417.

-Shiu SH y Bleecker AB. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE*, 2001; 113:22.

-Shou H, Bordallo P, Fan JB, Yeakley JM, Bibikova M, Sheen J, Wang K. Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2004; 101:3298-3303.

-Siddique M, Gernhard S, von Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD. The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties. *Cell Stress Chaperones*, 2008; 13:183-197.

-Singh A, Jha SK, Bagri J, Pandey GK. ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2015; 10(4):e0125168.

-Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho T-HD, Qu R. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci.*, 2000; 155:1-9.

-Snedden WA y Fromm H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol.*, 2001; 151:35-66.

-Soltész A, Smedley M, Vashegyi I, Galiba G, Harwood W, Vágújfalvi A. Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. *J. Exp. Bot.*, 2013; 64:1849-1862.

-Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol Lett*, 2003; 6:1025-1037.

-Soto A, Allona I, Collada C, Guevara M-A, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Aragoncillo C, Gomez L. *Plant Physiol.*, 1990; 120:521-528.

-Soulages JL, Kim K, Arrese EL, Walters C, Cushman JC. Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-proline)-type II structure. *Plant Physiol.*, 2003; 131:963-975.

-Soulages JL, Kim K, Walters C, Cushman JC. Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant Physiol.*, 2002; 128:822-832

-Steponkus PL, Uemura M, Webb MS. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat. Two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In *Advances in Low-Temperature Biology*, JAI Press, 1993; 2:211-312.

-Stone BA y Clarke AE. *Chemistry and Biology of (1-3)-β-D-Glucans*. Victoria, Australia: La Trobe University Press; 1992.

-Sun W, Montagu MV, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1577(1):1-9

-Sun W, Van Montagu M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim Biophys Acta*, 2002; 1577:1-9.

- Sunkar R, Bartels D, Kirch HH. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J.*, 2003; 35(4):452-464.
- Suzuki M, Kao CY, Cocciolone S, McCarty DR. Maize VP1 complements *Arabidopsis abi3* and confers a novel ABA/ auxin interaction in roots. *Plant J.*, 2001; 28:409-418.
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.*, 2012; 35:259-270
- Svensson J, Ismail AM, Palva ET and Close T. Dehydrins. In sensing, signalling and cell adaptation. Elsevier Science, 2002; 155-171.
- Svensson JT, Crosatti C, Campoli C, Bassi R, Stanca AM, Close TJ, Cattivelli L. Transcriptome analysis of cold acclimation in barley *albina* and *xantha* mutants. *Plant Physiol.*, 2006; 141(1):257-270.
- Szabo I, Bergantino E, Giacometti GM. Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO Reports*, 2005; 6:629-634.
- Takezawa D, Komatsu K, Sakata Y. ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone? *J. Plant Res.*, 2011; DOI 10.1007/s10265-011-0410-5
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011; 28:2731-2739.
- Tantos A, Friedrich P, Tompa P. Cold stability of intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett.*, 2009; 583:465-469
- Thierry L, Leprince AS, Lefebvre D, Ghars MA, Debarbieux E, Savoure A. Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279:14812-14818.
- Thomashow MF. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In E Meyerowitz, C Somerville, eds, *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1994; 807-834.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997; 25:4876-4882.
- Tolte D, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, Manon S, Teyssier E, Payet N, Avelange-Macherel MH, Macherel D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell*, 2007; 19:1580-1589.
- Tommasini L, Svensson JT, Rodriguez EM, Wahid A, Malatrasi M, Kato K, Wanamaker S, Resnik J, Close TJ. Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional and Integrative Genomics*, 2008; 8:387-405.
- Ton J y Mauch-Mani B. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.*, 2004; 38:119-130.
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends*

- Plant Sci., 2009; 14:310-317.
- Trent JD. A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea. *FEMS Microbiol Rev*, 1996; 18:249–58.
 - Tunnacliffe A y Wise MJ. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 2007; 94:791-812.
 - Tyedmers J, Mogk A, Bukau B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2010; 11:777-788.
 - Ullah H, Chen J, Young J, Im K, Sussman M, Jones AM. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in Arabidopsis. *Science*, 2001; 292:2066-2069.
 - Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K. Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein kinases are induced by drought and high salt stresses in Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. Genet.*, 1994; 224:331-340.
 - Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki B, Hirayama T, Shinozaki K. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell*, 1999; 11:1743-1754
 - Van Montfort R, Slingsby C, Vierling E. Structure and function of the small heat shock protein/á-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem*, 2001; 59:105-56.
 - Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P. The small heat-shock protein IbpB from Escherichia coli stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J Biol Chem*, 1998; 273:11032–11037.
 - Velten J. y Oliver M. J. Tr288, A rehydrin with a dehydrin twist. *Plant Mol. Biol.*, 2001, 45: 713-722.
 - Verma DPS y Hong Z. Plant callose synthase complexes. *Plant Mol Biol.*, 2001; 47:693-701.
 - Verslues E, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, 2006; 45:523-539.
 - Vierling E. The heat shock response in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 1991; 42:579-620.
 - Volkov RA, Panchuk II, Mullineaux PM, Schoffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis. *Plant Mol Biol.*, 2006; 61:733-746
 - Volkov RA, Panchuk II, Schoffl F. Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Mol Biol*, 2005; 57:487-502.
 - Walters RG. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 2005; 56:435-447.
 - Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 2003; 218:1-14.
 - Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. Role of plant heat- shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.*, 2004; 9:244-252.

- Wang X, Ulla H, Jones A, Assmann S. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science*, 2001; 292:2070-2072.
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot*, 1996; 47:325-338.
- Waters ER. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J. Exp. Bot.*, 2013; 64:391-403.
- Wehmeyer N, Hernandez LD, Finkelstein RR, Vierling E. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol*, 1996; 112:747-57
- Weiss J y Egea-Cortines M. Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress. *Journal of Applied Genetics*, 2009; 50:311-319.
- Williams WP y Allen JF. State 1/State 2 changes in higher plants and algae. *Photosynth. Res.*, 1987; 13:19-45.
- Wisniewski M, Webb R, Balsamo R, Close TJ, Yu XM, Griffith M. Purification, immunolocalization, cryoprotective and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiol. Plant.*, 1999; 105:600-608.
- Wood JM, Bremer E, Csonka LN, Kraemer R, Poolman B, van der Heide T, Smith LT. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2001; 130(3):437-460
- Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.*, 1995; 11:441-469.
- Wu Y, Kuzma J, Marechal E, Graeff R, Lee HC, Foster R, Chua NH. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science*, 1997; 278:2126-2130.
- Xiong L y Zhu J-K. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiologia Plantarum*, 2001; 112:152-166.
- Xiong L, Schumaker K, Zhu JK. Cell signaling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell*, 2002; 14:165-183.
- Xu DP, Duan XL, Wang BY, Hong BM, Ho THD, Wu R. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.*, 1996; 110:249-257.
- Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994; 6:251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci*, 2005; 10:88-94
- Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, 1993; 238:17-25.
- Yokoi S, Bressan RA, Hasegawa PM. Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report*, 2002; 25-33.

-Yoshida T, Sakuma Y, Todaka D, Maruyama K, Qin F, Mizoi J, et al. Functional analysis of an Arabidopsis heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008; 368(3):515-521.

-You MK, Shin HY, Kim YJ, Ok SH, Cho SK, Jeung JU, Yoo SD, Kim JK, Shin JS. Novel bifunctional nucleases, OmBBD and AtBBD1, are involved in abscisic acid-mediated callose deposition in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 2010; 152:1015-1029.

-Zarsky V, Garrido D, Eller N, Tufy J, Vicente O, Schoffl F, et al. The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant Cell Environ.*, 1995; 18:139–47.

-Zhang J, Li X, He Z, Zhao X, Wang Q, Zhou B, Yu D, Huang X, Tang D, Guo X, Liu X. Molecular character of a phosphatase 2C (PP2C) gene relation to stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Mol. Biol. Rep.*, 2013; 40(3):2633-2644.

-Zhang JZ, Creelman RA, Zhu JK. From laboratory to field. Using information from Arabidopsis to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol.*, 2004; 135:615-621.

-Zhang T, Chen S, Harmon AC. Protein phosphorylation in stomatal movement. *Plant Signal Behav.*, 2014; 9(11):e972845.

-Zhu J-K, Liu J, Xiong L. Genetic analysis of salt tolerance in Arabidopsis: Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, 1998; 10:1181-1191.

-Zhu JK. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2001; 4:401-406.

-Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002; 53:247-273

-Zielinski RE. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998; 49:697-725.

-Zivak M, Brestic M, Balatova Z, Drevenkova P, Olsovska K, Kaalji HM, Yang X, Allakhverdiev SI. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought. *Photosynth. Res.*, 2013; 117:529-546.

Versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling and Behavior*, 2011; 6(10):1503-1509.